

Medizinische Fakultät
der
Universität Duisburg-Essen

Innere Klinik
(Tumorforschung)
Westdeutsches Tumorzentrum

Klinisch-pharmakologische Untersuchungen im Rahmen einer klinischen Phase I-Studie
mit *trans*-Natrium-tetrachlorobis(indazol)Ruthenat(III)/Indazolhydrochlorid
(FFC14A) bei Patienten mit soliden Tumoren

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften in der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Magdalena Maria Henke
aus Gdingen (Polen)
2015

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Dipl.-Biochem. M.E. Scheulen

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. U.J. Vanhoefer

3. Gutachter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. D. Dobrev

Tag der mündlichen Prüfung: 8. März 2016

Publikationen:

Henke, M.M., Richly, H., Drescher, A., Grubert, M., Alex, D., Thyssen, D., Jaehde, U., Scheulen, M. E., Hilger, R.A. (2009): Pharmacokinetic study of sodium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)-ruthenate (III)]/-indazole hydrochloride (1:1.1) (FFC14A) in patients with solid tumors. International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics Vol.47 (1), 58-60

Henke, M.M, Richly, H., Grubert, M., Alex, D., Thyssen, Dagmar., Jaehde, U., Scheulen, M. E., Hilger, R. A. (2008): Pharmacokinetic study of sodium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)-ruthenate (III)]/-indazole hydrochloride (1:1.1) (FFC14A) in patients with solid tumors. Poster CESAR-Jahrestagung / CESAR Annual Meeting 2008

Meinen Kindern
Emilie und Kilian

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	8
1.1.	KREBS UND CHEMOTHERAPIE.....	8
1.2.	RUTHENIUM	9
1.2.1.	Entdeckung.....	9
1.2.2.	Struktur und chemische Klassifizierung/Verhalten	10
1.2.3.	Wirkungsmechanismus und Metabolisierung	11
1.2.4.	Anwendungsgebiete.....	14
1.2.5.	Nebenwirkungen	14
1.2.6.	Präklinische Untersuchungen.....	14
1.2.7.	Klinische Untersuchungen.....	19
1.3.	INDAZOL	19
1.3.1.	Entdeckung.....	19
1.3.2.	Struktur und chemisches Verhalten.....	19
1.3.3.	Anwendung	20
1.4.	PROTEINE	20
1.4.1.	Transferrin.....	20
1.4.2.	Humanserumalbumin	21
1.5.	ZIELSETZUNG DER KLINISCHEN PHASE I-STUDIE VON FFC14A	21
2.	MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1.	MATERIALIEN.....	23
2.1.1.	Chemikalien und Reagenzien	23
2.1.2.	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.3.	Geräte	25
2.1.4.	Arzneimittelzubereitung und Infusionszubehör	26
2.2.	HOCHLEISTUNGS – FLÜSSIGCHROMATOGRAPHIE	26
2.2.1.	Prinzip der HPLC	26
2.2.2.	Detektoren	28
2.2.3.	Elutionsmittel und Gradientensystem	30
2.3.	ANALYTIK VON INDAZOL	31
2.3.1.	Probengewinnung und –lagerung.....	31
2.3.1.1.	Plasmaproben.....	32
2.3.1.2.	Ultrafiltratproben	32
2.3.1.3.	Urinproben.....	32
2.3.1.4.	Zellen.....	32
2.3.2.	Probenaufarbeitung	32
2.3.2.1.	Ultrafiltratproben	32
2.3.3.	Geräteaufbau und Chromatographiebedingungen der HPLC.....	33
2.3.4.	Kalibrierung.....	33
2.4.	ICP-MS	34
2.4.1.	Prinzip der ICP-MS	34
2.4.2.	Detektionssystem	35
2.5.	ICP-MS ANALYTIK VON RUTHENIUM	36
2.5.1.	Probengewinnung und -lagerung.....	36
2.5.2.	Probenaufarbeitung	36
2.5.2.1.	Aufarbeitung von Plasmaproben	36
2.5.2.2.	Aufarbeitung von Ultrafiltratproben	36
2.5.2.3.	Aufarbeitung von Urinproben.....	36
2.5.2.4.	Zellaufarbeitung	36
2.5.2.5.	DNA Isolierung.....	37
2.5.3.	Geräteaufbau und Chromatographiebedingungen der ICP-MS	37
2.5.3.1.	Geräteparameter für die Messung von Plasma, Ultrafiltrat und Urin	37
2.5.3.2.	Geräteparameter für die Messung von DNA-Addukten	38

2.5.4.	<i>Kalibrierung</i>	39
2.5.4.1.	Herstellung der Standardlösung und der Kalibratoren.....	39
2.5.4.2.	Konzentrationsberechnung – Standardkurve für Plasmaproben.....	39
2.5.4.3.	Konzentrationsberechnung – Standardkurve für Ultrafiltrat.....	39
2.5.4.4.	Konzentrationsberechnung – Standardkurve für Urin.....	39
2.6.	VALIDIERUNG.....	40
2.6.1.	<i>Selektivität</i>	40
2.6.2.	<i>Messbereich und Linearität</i>	40
2.6.3.	<i>Stabilität</i>	41
2.6.4.	<i>Wiederfindung</i>	42
2.6.5.	<i>Richtigkeit und Präzision</i>	42
2.6.6.	<i>Robustheit und Qualitätskontrolle</i>	43
2.7.	PHARMAKOKINETISCHE METHODEN.....	43
2.7.1.	<i>Fitting Parameter</i>	44
2.7.2.	<i>Pharmakokinetische Parameter</i>	45
2.7.3.	<i>Angewendete Software</i>	48
2.8.	KLINISCHE STUDIE.....	48
2.8.1.	<i>Studienziele</i>	48
2.8.2.	<i>Studiendesign</i>	49
2.8.3.	<i>Studienprotokoll mit Probenentnahme für die Pharmakokinetik</i>	50
2.8.4.	<i>Klinische Dokumentation</i>	51
2.8.5.	<i>Eingeschlossene Patienten</i>	52
2.9.	STATISTISCHE METHODEN.....	53
2.9.1.	<i>Deskriptive Statistik</i>	53
2.9.2.	<i>Inferenzstatistik</i>	54
2.9.3.	<i>Korrelationsanalyse</i>	55
2.9.4.	<i>Regressionsanalyse</i>	56
3.	ERGEBNISSE	57
3.1.	BIOANALYTISCHE BESTIMMUNGSMETHODEN.....	57
3.1.1.	<i>ICP MS Analytik von Ruthenium</i>	57
3.1.2.	<i>HPLC Analytik von Indazol</i>	57
3.2.	VALIDIERUNG.....	58
3.2.1.	<i>Validierung der Analytik von Ruthenium im Plasma und Ultrafiltrat</i>	58
3.2.1.1.	Selektivität.....	58
3.2.1.2.	Messbereich und Linearität.....	59
3.2.1.3.	Stabilität.....	60
3.2.1.4.	Wiederfindung.....	61
3.2.1.5.	Robustheit und Qualitätskontrolle.....	62
3.2.1.6.	Richtigkeit und Präzision.....	62
3.2.2.	<i>Validierung der Analytik von Ruthenium in Urin</i>	64
3.2.2.1.	Selektivität.....	64
3.2.2.2.	Messbereich und Linearität.....	65
3.2.2.3.	Stabilität.....	66
3.2.2.4.	Wiederfindung.....	66
3.2.2.5.	Robustheit und Qualitätskontrolle.....	66
3.2.2.6.	Richtigkeit und Präzision.....	66
3.2.3.	<i>Validierung der Analytik von Indazol in NaCl und Plasma</i>	67
3.2.3.1.	Selektivität.....	67
3.2.3.2.	Messbereich und Linearität.....	68
3.2.3.3.	Stabilität und Wiederfindung.....	69
3.2.3.4.	Richtigkeit und Präzision.....	70
3.2.3.5.	Robustheit und Qualitätskontrolle.....	71
3.3.	DNA-ANALYTIK.....	71
3.4.	PHARMAKOKINETISCHE DATENANALYSE.....	72
3.4.1.	<i>Pharmakokinetische Parameter und Modellfitting von Ruthenium</i>	72
3.4.2.	<i>Pharmakokinetische Parameter und Modellfitting von Indazol</i>	81

3.4.3.	<i>Patientenbezogene Ergebnisse</i>	82
3.5.	STATISTISCHE DATENANALYSE	83
4.	DISKUSSION	86
4.1.	BIOANALYTIK	86
4.2.	PHARMAKOKINETIK RUTHENIUM - ICP-MS	89
4.2.1.	<i>Maximale Konzentration c_{max}</i>	89
4.2.2.	<i>Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve AUC</i>	90
4.2.3.	<i>Halbwertszeit $t_{1/2}$</i>	91
4.2.4.	<i>Clearance Cl</i>	91
4.2.5.	<i>Verteilungsvolumen V_{ss}</i>	92
4.3.	PHARMAKOKINETIK INDAZOL - HPLC	92
4.4.	DNA-ADDUKTE	93
4.5.	GALENIK	93
4.6.	WIRKUNGSMECHANISMUS	94
4.7.	SCHLUSSBEMERKUNGEN	95
5.	ZUSAMMENFASSUNG	98
6.	LITERATURVERZEICHNIS	99
7.	ANHANG	105
8.	DANKSAGUNG	110
9.	CURRICULUM VITAE	111

1. Einleitung

1.1. Krebs und Chemotherapie

Krebs ist nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Für seine Behandlung stehen Chirurgie und Radiotherapie als lokale Behandlungsmaßnahmen des Primärtumors oder einzelner Metastasen und antineoplastische Chemotherapie, Hormontherapie und Immuntherapie als systemische Behandlungsmaßnahmen bei lokal fortgeschrittener oder metastasierter Erkrankung zur Verfügung. (Brockhaus Enzyklopädie, 2006, Krämer, 2003) Der Begriff der Chemotherapie geht auf Paul Ehrlich, der Ende des 19. Jahrhunderts den körpereigenen Abwehrkräften eine spezifische, gegen Krankheitserreger gerichtete Therapie gegenübergestellt hat, zurück. Mit seiner "Chemotherapia specifica" bezeichnete er die Anwendung von Substanzen, die für Krankheitserreger tödlich waren ohne den Patienten zu schädigen. (Satter, 1962)

Die moderne Ära der Chemotherapie bösartiger Erkrankungen begann kurz nach dem 2. Weltkrieg und hat sich bis heute rasant weiterentwickelt. Schnell wachsende Tumoren können am günstigsten durch eine Chemotherapie beeinflusst werden. Wenn jedoch die Volumenverdopplungszeit eines Tumors mehr als 10 Tage beträgt, kann auch mit einer Kombinationschemotherapie keine kurative Behandlung mehr erzielt werden. Das homöostatische Gleichgewicht aus Proliferation, Differenzierung und Apoptose oder Nekrose einer Zelle wird durch genetische Instruktionen und extrazelluläre Signale gesteuert. Ist dieser Mechanismus gestört, kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen den Zellzyklen und -phasen. Die Entstehung einer Tumorerkrankung ist auf das Wachstum und die Vermehrung einer einzelnen primären Tumorzelle, deren Genom geschädigt ist, zurückzuführen. Meistens sind genetische Strukturen, die das Zellwachstum regulieren, betroffen. Die Tumorentstehung benötigt mehrere durch Mutationen bedingte Veränderungen. Typische Kennzeichen malignen Wachstums sind die lokale Infiltration und die Fähigkeit zur Metastasierung. Das Tumorstadium geht von der initial exponentiellen Phase mit zunehmender Größe des Tumors in eine Gleichgewichtsphase über. Derartiges Wachstum wird als Gompertz-Kinetik bezeichnet. (Krämer, 2003, Zenz, 2004)

Die größte Wirksamkeit klassischer Zytostatika ist dann erreicht, wenn sich die Zellen im Zellzyklus befinden, wobei dieselbe Dosis eines Zytostatikums einen konstanten Anteil der Tumorzellen abtötet. Dabei liegt eine Kinetik 1. Ordnung vor, so dass die getötete Zellzahl immer kleiner wird. Ist die klinische Remission erreicht, muss die Therapie mit derselben Intensität weiter fortgesetzt werden, um ein Rezidiv zu verhindern. Diese Art des Tumorstadiums folgt der sog.

„log cell kill-Hypothese“. Es gibt auch Ausnahmen, bei denen die Tumorreduktion nicht einer Kinetik 1. Ordnung folgt. Dieses Phänomen erklärt die „Norton-Simon-Hypothese“. Danach setzt sich der Tumor zu unterschiedlichen Therapiezeitpunkten aus unterschiedlich großen Wachstumsfraktionen zusammen mit der Folge geringerer Chemotherapiesensibilität. (Krämer, 2003)

Um die antineoplastische Chemotherapie gezielt und mit Erfolg einsetzen zu können, ist es wichtig, den Wirkungsmechanismus, die Nebenwirkungen sowie die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Vorgänge zu erforschen und zu beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit soll die maximal tolerierbare Dosis (MTD) und die pharmakokinetischen Parameter wie die Resorption, Verteilung und Elimination von *trans*-Natrium-tetrachlorobis(indazol)ruthenat(III)/Indazolhydrochlorid (FFC14A) bestimmt sowie Rückschlüsse auf den Wirkungsmechanismus dieser Substanz gezogen werden. Die Phase I Studie wurde nach einem Dosisescalations-Protokoll mit FFC14A durchgeführt.

1.2. Ruthenium

1.2.1. Entdeckung

Bereits 1804 bemerkten Fourcroy und Vauquelin bei der Behandlung bestimmter Lösungen der Platinmetalle mit Zink die Bildung einer azurblauen Lösung. (Keppler et al., 1993) Jedoch schrieb Vauquelin zehn Jahre später die entstandene Blaufärbung dem Iridium zu, so dass Ruthenium immer noch unentdeckt blieb. (Seddon, 1996, Seddon, 1984) Im Jahre 1827 gab Gottfried Wilhelm Osann (1797-1866) die Entdeckung dreier neuer Platinmetalle, darunter befand sich Ruthenium, bekannt. Kurze Zeit danach nahm er 1829 seinen Anspruch auf die Entdeckung zurück, da Berzelius in den an ihn gesandten Proben keine neuen Metalle gefunden hatte. (Helvi Hödrejäv, 2004, Pitchkov, 1996) Ruthenium wurde erstmals 1844 von Karl Karlovitch Klaus (1796-1864), der am 11. Januar in Dorpat (heute Tartu, Estland) geboren wurde, isoliert und benannt. Der Name des Platinmetalls leitet sich von der lateinischen mittelalterlichen Bezeichnung Ruthenia für Russland ab. Nachdem Klaus 1827 an einer Expedition am russischen Ural teilnahm und dort diverse Fabriken, Minen sowie Gold- und Platinlagerstätten besichtigte, entwickelte er ein sehr großes Interesse an den Platinmetallen. Für seine Forschung bekam er zwei Pfund des Platinerzes, das nach der Platingewinnung zurückblieb, und versuchte daraus die verbliebenen Platinmetalle zu isolieren. Seine Untersuchungen begann er 1841 und fand bald „a new body, but I could not separate it at first“. Später gelang ihm die Extraktion von Ruthenium aus einer Chloridverbindung

mittels Zink und er gewann auf diese Weise 6 Gramm eines grauen Rutheniumpulvers. (Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie: Platin, 1938, Wikipedia Ruthenium, 2015, Pitchkov, 1996) Die Elemente der Platinmetalle haben eine relativ hohe Affinität an Stickstoffliganden, insbesondere solche, die in wichtigen Biomolekülen wie Proteinen, Koenzymen und Nukleinsäuren auftreten. Ruthenium kann auf vielfältige Art und Weise Komplexe, meistens in der niedrigen Oxidationsstufe, mit diesen Biomolekülen eingehen. Diese Eigenschaft ermöglicht die Entwicklung und Gestaltung neuer antitumoral wirksamer Rutheniumverbindungen. Viele Untersuchungen lassen vermuten, dass die DNA als Target für viele onkostatisch wirksame Rutheniumkomponenten dient und eine kovalente Bindung an die Nukleinsäuren gebildet wird. Weiterhin wird angenommen, dass eine Transformation der Rutheniumkomplexe *in vivo* stattfindet und sie deshalb als "prodrugs" angesehen werden, die diversen metabolischen Prozessen zur ihrer Aktivierung unterliegen. Diese können sowohl in der Blutbahn als auch intrazellulär erfolgen. (Clarke, 1993)

1.2.2. Struktur und chemische Klassifizierung/Verhalten

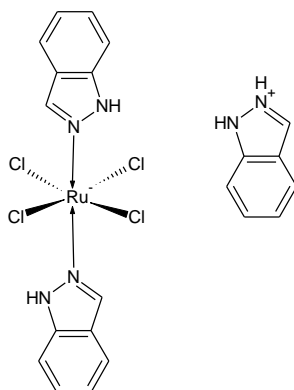


Abbildung 1 *trans*-Natrium-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat (III)/Indazolhydrochlorid (FFC14A)

Ruthenium ist ein seltenes Element der achten Gruppe des Periodensystems, der Platinmetalle. In der Natur tritt Ruthenium vor allem als Begleiter des Platins auf und kommt in der Erdrinde nur mit einer Häufigkeit von 2×10^{-6} % vor. (Brockhaus Enzyklopädie, Band 23, 2006) Das homologe Element zu Ruthenium ist das Eisen aus der Eisengruppe, jedoch unterscheiden sich beide wesentlich in ihrer Chemie. Ruthenium gehört mit einer Dichte von $12,45 \text{ g cm}^{-3}$ zu den leichten Platinmetallen wie Rhodium und Palladium. Die senkrechte Gruppe der Platinmetalle Ruthenium und Osmium im Periodensystem wird auch als Osmiumgruppe bezeichnet. (Holleman, Wiberg,

2007, Riedel, Janiak, 2007) Es ist ein sehr hartes (Härte nach MOHS 6,5), silberweiß glänzendes, sprödes, pulverisierbares Edelmetall. (Brockhaus Enzyklopädie, Band 23, 2006) Die relative Atommasse beträgt 101,07 mit einer Ordnungszahl Z 44. (Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie, Ruthenium, 1938, Riedel, Janiak, 2007) Der Schmelzpunkt liegt bei 2.450°C, der Siedepunkt bei 4.150 °C und es kristallisiert mit hexagonal-dichter Packung. In den Ruthenium-Verbindungen liegt es in den Oxidationsstufen 0 bis +8 vor, wobei die zwei- und dreiwertigen Verbindungen am wichtigsten sind. (Brockhaus Enzyklopädie, Band 23, 2006, Riedel, Janiak, 2007) Ruthenium ist in seinen chemischen Eigenschaften deutlich von dem homologen Eisen zu unterscheiden. Es ist sehr reaktionsträge und wird nicht einmal von Königswasser unter 100°C angegriffen. Erst bei höheren Temperaturen reagiert Ruthenium bei Rotglut mit Sauerstoff und bildet RuO₂. Ruthenium löst sich am besten in alkalischen, oxidierenden Schmelzen (z.B. NaOH + Na₂O₂). (Hollemann, Wiberg, 2007, Riedel, Janiak, 2007)

FFC14A gehört zu den vielversprechendsten neu entwickelten Ruthenium-Verbindungen der letzten Jahre. In diesem anionischen, einfach geladenen Komplex ist das dreiwertige Rutheniumion an zwei axial 1H-Indazol- und vier horizontal angeordneten Chlor-Liganden gebunden. Die Summenformel für FFC14A lautet C₂₁H₁₉Cl₄N₆Ru, woraus sich ein Molekulargewicht von 598,31 g/mol berechnen lässt. (Faustus Forschungs Compagnie, 2003)

Er ist bis zu $8,2 \times 10^{-4}$ mol/L (0,49g/L) in Wasser löslich. Es ist besser in DMSO, Ethanol, Methanol, DMF, Aceton und Acetonitril löslich. Die Löslichkeit des Natriumsalzes dieses Komplexes ist 30mal höher als die des Indazolsalzes. (Kratz, Hartmann et al., 1994)

FFC14A ist aus RuCl₃ und Indazol in Ethanol mit einem Zusatz von Salzsäure synthetisiert worden. HPLC-Untersuchungen des Komplexes haben eine 1%ige Abnahme der Konzentration pro Stunde in wässriger Lösung bei Raumtemperatur gezeigt. Damit ist der Komplex stabil genug, um in Form einer Infusion appliziert zu werden. Die Hydrolyse verlangsamt sich mit niedrigeren pH-Werten und führt zur Entstehung von Aquakomplexen. (Kratz, Hartmann et al., 1994, Seddon, 1996, Smith et al., 1996)

1.2.3. Wirkungsmechanismus und Metabolisierung

Für FFC14A konnte gezeigt werden, dass es unter physiologischen Bedingungen in Blutserum an Serumproteine gebunden wird. (Kratz, Hartmann et al., 1994) Zwischen 80-90% des Komplexes binden an Albumin (M_r: 66,5 kDa), das in hoher Konzentration im Blut vorhanden ist, und eine geringere Menge an Transferrin (M_r: 80 kDa), ein Eiweißprotein, das für den Fe³⁺-Transport im Körper verantwortlich ist. (Kretz, Mullinaci et al., 1992) In weiteren Untersuchungen konnte

ermittelt werden, dass 5 Mol FFC14A an Albumin und 2 Mol an apo-Transferrin mit unterschiedlicher Geschwindigkeit binden. (Hartmann, 1995, Kratz, Hartmann, 1994, Kratz, Messori, 1993, Kratz, Mullinaci, 1992) Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 50 kDa reagieren schneller und bevorzugter als kleinere. Die Reaktion mit apo-Transferrin dauert ca. 15 Minuten und die mit dem Serum und Albumin ca. 2 Stunden. (Kratz, Mullinaci, 1992) Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der an apo-Transferrin gebundene Ruthenium(III)komplex signifikant höhere antitumorale Aktivität gegen menschliche Darmkrebszellen als der an Albumin gebundene oder freie Anteil zeigt. (Kratz, Hartmann, 1994) FFC14A kann als Prodrug, eine zunächst inaktive Verbindung, angesehen werden. Erst nach der Applikation in den Körper erfolgt ein metabolischer Umwandlungsprozess in einen aktiven Wirkstoff. (Albert, 1958, Clarke, 1993) In diesem Fall wird vermutet, dass eine metabolische Aktivierung durch Hydrolyse und die Reduktion von Ruthenium(III) zu Ruthenium(II) in hypoxischen Zellen stattfindet. Dadurch wird der Komplex aus dem Ruthenium(III)proteinkonjugat freigesetzt. Der vermutlich so aktivierte Komplex kann an Nukleinsäuren binden. (Clarke, 1993, Pongratz et al., 2004)

FFC14A wird transferrinabhängig und transferrinunabhängig in die Zelle transportiert. Die transferrinvermittelte Aufnahme ist effizienter, wenn das Transferrinmolekül mit Fe^{3+} gesättigt ist. Die Sättigung mit Fe^{3+} sollte den physiologischen Bedingungen entsprechen und ca. 30% betragen. Nach zweistündiger Inkubation mit Zellen befinden sich durchschnittlich 55% des intrazellulären Rutheniums im Nucleus, während 45% im Cytosol bzw. anderen zellulären Komponenten verbleiben. Transferrin gehört zur Gruppe der Siderophiline. Es ist ein einkettiges eisenbindendes β -Glycoprotein ohne Häm und besteht aus über 700 Aminosäuren, die in zwei gleichgroßen Untereinheiten mit je einer Eisenbindungsstelle, bestehend aus zwei Tyrosin-, einem Histidin- und einem Aspartatrest sowie einem Bicarbonatanion, welches in einer angrenzenden Tasche gebunden ist, angeordnet sind. Normalerweise wird Transferrin an die Rezeptoren auf der Proerythrozytenoberfläche gebunden, anschließend in die Zelle aufgenommen, wo es das Eisen abgibt. Aus der Zelle geht es ins Blut als eisenfreies Apotransferrin zurück. (Hunnius, 1998, Pongratz et al., 2004) Krebszellen haben einen hohen Bedarf an Eisen und bilden deshalb eine hohe Anzahl von Transferrinrezeptoren auf ihrer Oberfläche aus. Genau diesen Mechanismus macht man sich zur Einschleusung des Komplexes in die Tumorzelle zu nutze. Aufgrund der Tatsache, dass Ru(III)-komplexe auch an Transferrin binden, wird angenommen, dass FFC14A über eine transferrinvermittelte Endozytose in den Zellen akkumuliert wird. (Pongratz, 2004)

Die Bindung von FFC14A an Apotransferrin erfolgt über die Bildung zweier Zwischenprodukte, die dann innerhalb von 5 Minuten an das Protein binden. Diese Reaktion läuft nur in Anwesenheit

von Bicarbonat ab. Die Proteinbindung ist unter sauren Bedingungen (pH 4) mit Zitronensäure oder durch Zusatz von ATP reversibel. (Kratz, Keppler et al., 1994, Pongratz et al., 2004) Ein Transferrinmolekül kann mit bis zu 10 *trans*-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III)komplexen Addukte bilden. Werden im Apo-Transferrin die beiden Eisenbindungsstellen mit *trans*-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat beladen, bewirkt dies eine für die Bindung an den Transferrinrezeptor ungünstige Proteinkonformation. Es hat sich gezeigt, dass zweifach eisenbeladenes Transferrin eine höhere Affinität, einfach beladenes mittlere Affinität und das ungeladene Apo-Transferrin die niedrigste Affinität gegenüber den Rezeptoren zeigt. Folglich ist die Affinität von Transferrin an die Rezeptoren von der Beladung mit Metallionen abhängig. Um diesen Zusammenhang genau zu prüfen, wurden unterschiedliche Inkubationsversuche durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass die Akkumulation von *trans*-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat, gebunden an Fe(III)-Transferrin, zweifach höher in der Zelle war, als die des freien *trans*-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III) und 4- bis 5fach höher als die des transferringegebenen *trans*-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III) in Abwesenheit von Eisen. Die Eisenbindung spielt eine wichtige Rolle, um eine Proteinkonformation zu erhalten, die das Erkennen des Komplexes durch Transferrinrezeptoren auf der Zelloberfläche begünstigt. Der wichtigste Faktor für die effektive transferrinvermittelte zelluläre Aufnahme und für die antiproliferative Aktivität von *trans*-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III) ist der Sättigungsgrad mit Eisen. (Hunnius, 1998, Pongratz et al., 2004)

Um den Wirkungsmechanismus weiter aufzuklären, hat Clyde A. Smith Untersuchungen an menschlichem Lactoferrin durchgeführt. Er fand nach der Bindung von Metallen an Apo-Lactoferrin eine charakteristische geschlossene Proteinstruktur, die für die Bindung an Rezeptoren essentiell zu sein scheint. Die wichtigsten Bindungsstellen des Proteins enthalten einen Histidinrest. Aus dem Ruthenium(III)komplex werden einer oder mehrere Chloridliganden durch Wasser verdrängt, so dass das Rutheniumatom dann kovalent an eine Histidinseitenkette des Proteins gebunden wird. Während der Bindung erfolgt kein signifikanter Verlust der heterocyclischen Liganden. Anscheinend kann der Transferrinrezeptor zwischen metallgebundener und metallfreier Form des Transferrins unterscheiden. (Smith et al., 1996)

Desweiteren sind, wie im Fall der Platinkomplexe, auch Interaktionen der Rutheniumkomplexe mit der DNA, die ebenfalls für eine antitumorale Aktivität verantwortlich sein könnten, anzunehmen. Hierzu wurden Versuche mit Kalbsthymus-DNA durchgeführt, die eine kovalente Bindung der Ruthenium(III)komplexe zeigten. Der genaue Mechanismus ist noch nicht geklärt. Es konnte festgestellt werden, dass das Komplexanion $[\text{Ru}^{\text{III}}\text{Cl}_4(\text{ind})_2]^-$ dabei mit der Nucleobase

9-Methylguanin und DNA reagiert. (Egger et al., 2005, Hartmann, 1995, Keppler, Hartmann, 1994, Pieper, Keppler, 1998)

1.2.4. Anwendungsgebiete

Das vorläufige Indikationsspektrum, basierend auf präklinischen Untersuchungen von FFC14A, betrifft solide Tumoren wie Darmtumoren. (Faustus Forschungs Compagnie, 2003, Smith et al., 1996) Weiterhin konnte man vielversprechende Ergebnisse in experimentellen Untersuchungen mit unterschiedlichen Tumorzellen, wie P 388 Leukämie-, Stockholm Ascites Tumor-, Sarcoma 180 Ascites Tumor-, Ehrlich Ascites Tumor- und MAC 15A Colon Tumor-Zellen gewinnen. (Keppler, Lipponer et al., 1993)

1.2.5. Nebenwirkungen

Die Toxizität scheint von der Bindung des Ruthenium(III)komplexes an Proteine abzuhängen. Vermutlich werden die Nebenwirkungen durch den freien Ruthenium(III)komplex verursacht, da der an Proteine gebundene Anteil abgefangen wird und wahrscheinlich aufgrund der transferrinvermittelten Aufnahme in die Tumorzellen weniger toxisch zu sein scheint. (Pieper, 1998) Aus den präklinischen Untersuchungen kann man ableiten, dass Nebenwirkungen vornehmlich die Leber und die Niere betreffen, sowie hämatologische Auswirkungen haben, wie das Auftreten einer Erythropenie und Anstieg von Kreatinin- und Leberenzymen. (Depenbrock et al., 1997, Keppler, Lipponer et al., 1993)

1.2.6. Präklinische Untersuchungen

Die pharmakologischen, präklinischen Untersuchungen zeigen, dass Ruthenium(III)komplexe in die Tumorzellen mittels des Eisentransporteiweißproteins Transferrin eingeschleust und dort akkumuliert werden. Um Näheres über den FFC14A Komplex nach einer Injektion bzw. Infusion zu erfahren, wurden Interaktionen unter physiologischen Bedingungen (Puffer pH = 7,4) mit dem Serum und Serumproteinen wie HSA und Apo-Transferrin mittels spektroskopischer (VIS- und CD-Spektroskopie) Methoden sowie LPLC, HPLC und Ultrafiltration durchgeführt. Nach Zugabe des Komplexes ins Serum wurden bei 37°C ca. 80-90% des Komplexes an Albumin und ein geringer Anteil an Transferrin sowie α - und β -Lipoglobuline, nicht aber an Proteine mit einem Molekulargewicht unter 50 kDa gebunden. Die Bindungsreaktion mit Albumin und Transferrin erfolgt relativ schnell, erfordert jedoch die Anwesenheit von Bicarbonat. CD-Spektroskopie zeigte,

dass Apo-Transferrin zwei und Albumin fünf Äquivalente des Komplexes binden (vgl. Kap.1.2.3). (Kratz, Mullinaci et al., 1992)

Detaillierte Informationen über die Art der Bindung von FFC14A an das Transferrinmolekül konnten mittels Röntgen- Kristallographie und Fourieranalyse des Apolactoferrinmoleküls, das dem Apo-Transferrin in den meisten Eigenschaften gleicht, gewonnen werden. Des Weiteren hat das Apolactoferrin sehr große strukturelle Ähnlichkeit mit Transferrin, so dass die Bindungseigenschaften beider Proteine weitestgehend gleich zu sein scheinen. Die Proteine haben zwei Untereinheiten, auf denen sich je eine Bindungsstelle befindet. Nachdem ein Metall gebunden wird, schließt sich die entsprechende Domäne des Proteins über das Metallion und sein assoziiertes Anion. Die Fourieranalyse zeigte, dass die Histidinreste von besonderer Bedeutung für die Bindung sind. Eine hohe Bindungsaffinität wies der sich in der offenen N-Bindungsstelle für Eisen im Apolactoferrin befindende His 253 Rest auf. Der His 597 Rest im C-Lappen wurde durch den Komplex nicht besetzt, da an dieser Stelle eine geschlossene Proteinkonformation vorliegt, die diese Reaktion verhindert. In Lösung zeigte der His 597 Rest eine hohe Affinität an FFC14A während der sich auf der Oberfläche befindende His 654 Rest eine geringere Affinität aufwies. In allen Fällen wird ein Chloridligand verdrängt und das Rutheniumatom ist kovalent an die Histidinseitenkette des Proteins gebunden. (FEBS, 1977, Smith et al., 1996)

Zur Antitumorwirksamkeit muß FFC14A aus der Proteinbindung nach zellulärer Aufnahme in einem sauren Kompartiment der Zelle freigelassen werden. Kratz, Harmann und Mitarbeiter (1994) konnten nachweisen, dass fast das gesamte FFC14A innerhalb einer Stunde freigesetzt wird, wenn es mit einem 100fachen Überschuss an Zitronensäure bei einem pH 4-5 inkubiert wird.

Verschiedene Untersuchungen des Bindungsverhaltens von FFC14A an Maus- und Humantransferrin zeigten signifikante Unterschiede, so dass Heterotransplantate in diesem Fall nicht zur Vorhersage der Wirksamkeit von FFC14A auf Tumorzellen herangezogen werden können. (Faustus Forschungs Compagnie, 2003)

Pharmakokinetische Eigenschaften von FFC14A wurden zunächst in drei Ratten nach einer intravenösen Einzelgabe in die Schwanzvene untersucht. Die totale Dosis betrug 8,4 mg pro kg KG in einem Volumen von 20 ml pro kg KG pro Injektion. Die Blutentnahme erfolgte 1 h, 6 h, 24 h, 48 h und 120 h nach Applikation und wurde nach einer Etherbetäubung aus dem retrobulbulären Venenplexus durchgeführt. Als Antikoagulanzen wurde Li-Heparin verwendet. Anschließend wurde das Plasma durch Zentrifugation gewonnen und der Rutheniuminhalt mittels ICP-MS bestimmt. Unter Annahme, dass ein offenes Zwei-Kompartiment Modell vorliegt, betrugen die

Halbwertszeiten während der Verteilungsphase (0-6 h) 15,6 h und der Eliminationsphase (24 h und länger) 96 h. Die kalkulierte AUC_{∞} lag bei 2,296 mg*h/L. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden nach einmaliger wöchentlicher Gabe zusätzliche Proben der Testsubstanz genommen. Die Plasmakonzentrationen erreichten im Steadystate 52mg/L. Im Ultrafiltrat wurde kein Ruthenium (Gehalt unter 0,1 mg/L) gefunden. (Hartinger, Jakupec et al., 2008, Faustus Forschungs Compagnie, 2003)

Biologische Effekte wurden an humanen kolorektalen Krebszelllinien SW480 und HT-29 untersucht und zeigten, dass morphologische Änderungen und Zellverlust während der Untersuchung in Gegenwart des Arzneimittels stattfinden. Es konnten spezifische apoptotische Körperchen ("specific apoptotic bodies") detektiert werden. Darüber hinaus stieg der apoptotische Index nach 4 Stunden beträchtlich an. Diese Ergebnisse konnten durch die Detektion eines Spaltprodukts der Procaspase 3, einer Effektor-Caspase, die den programmierten Zelltod einleitet, bekräftigt werden. Von besonderer Bedeutung ist der Redoxstatus in der Zelle, da durch die antioxidative Wirkung von N-Acetylcysteins die Einleitung der Apoptose durch FFC14A nivelliert wird. Bcl-2, das den programmierten Zelltod verhindert, indem es die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien blockiert, ist an der durch FFC14A hervorgerufenen apoptotischen Reaktion nicht beteiligt. (Alberts, Bray et al., 1995, Dittrich, 2006) Damit liegt ein ungewöhnlicher Weg des programmierten Zelltodes durch FFC14A vor. (Faustus Forschungs Compagnie, 2003, Hartinger, Jakupec et al., 2008)

Die Antitumorwirksamkeit wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die *In-vitro*-Wirksamkeit wurde an neun Kolonkarzinomzelllinien (COLO 205, SW 620, HCT 116, DLD-1, SW 480, Lovo, LS 180, SW 707, SW 948) getestet. Die unter physiologischen Bedingungen gemessene mittlere inhibitorische Konzentration war mit der von 5-FU vergleichbar und niedriger als die von Methotrexat. Weitere Untersuchungen zeigten Antitumorwirksamkeit von FFC14A in Leukämie-, Kolonkarzinom- und Bronchalkarzinomzellen. Versuche an frisch explantierten humanen Tumorgewebe, wie Brust-, Nieren-, Bronchial-, Hoden-, Eierstock-, Kolorektal-, Ösophagus-, Magen-, Gallenblase- und Gebärmutterkrebs und Mesotheliom und Sarkom zeigten nach einer Inkubationszeit von 1 h eine konzentrationsabhängige Aktivität des Ruthenium-komplexes in 41% der Proben. In einer vergleichbaren Langzeituntersuchung (21-28 Tage) wurde eine Aktivität gegen fast jeden Tumortyp (80%) festgestellt. In beiden Versuchsreihen wurden Konzentrationen von 1, 10 und 100µg/ml *trans*-Natrium-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat(III) miteinander verglichen, wobei die höchste Ansprechrate bei einer maximalen Konzentration von 100µg/ml beobachtet wurde. (Depenbrock, Schmelcher et al., 1997, Faustus Forschungs Compagnie, 2003, Galeano et

al., 1992, Hartinger, Jakupec et al., 2008) Ein Vergleich von FFC14A mit neun anderen antitumorwirksamen klinisch angewandten zytotoxischen Substanzen wie Bleomycin, Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, 5-FU, Methotrexat, Mitomycin-C, Paclitaxel und Vinblastin zeigte, dass nach einer Inkubationszeit von 1 h nur der Wirkstoff Paclitaxel gegen rutheniumresistente Tumore wirksam war. Zellen, die gegen Cisplatin, Doxorubicin, 5-FU, Vinblastin und Etoposid resistent waren, wiesen eine deutliche Sensitivität gegenüber FFC14A auf, wobei 90% der gegen Cisplatin resistenten Tumorgewebe nach Langzeitexposition empfindlich reagierten. (Depenbrock, Schmelcher et al., 1997) Von besonderer Bedeutung ist das Gegenion von FFC14A. Die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) des Natriumsalzes ist höher (200 μ M) als die des Indazolsalzes (80 μ M). Durch die Auflösung des Natriumsalzes und anschließende Zugabe von Indazolhydrochlorid im Überschuss erreicht man eine Zunahme der Hemmwirkung von FFC14A. Mit einem fünffachen Überschuss wird die IC_{50} auf 30 μ M gesenkt. (Faustus Forschungs Compagnie, 2003)

Die *In-vivo*-Aktivität von FFC14A wurde in verschiedenen Tiermodellen in der Maus und Ratte getestet. Dabei hat man seine Antitumorwirksamkeit in Tieren mit P388 Leukämie mit der von Cisplatin und 5-FU verglichen. Der Komplex zeigte eine mäßige Aktivität $T/C = 160\%$ im Vergleich zu 175% für Cisplatin und 144% für 5-FU. In weiteren experimentellen Tumormodellen wurde eine bessere Wirksamkeit gegen das Sarkom 180 ($T/C = 185\%$) und Stockholm Aszites Tumor ($T/C = 250\%$) gemessen. Die höchste Überlebensrate wurde in Tieren mit MAC15A Kolonkarzinom und Ehrlich Aszites Tumor mit einer $T/C > 300\%$ erreicht. Weitere Versuche wurden an männlichen Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Kolorektale Karzinome wurden mit einer 0,2%-igen Acetoxymethylmethylnitrosamin-Lösung induziert, die einmal wöchentlich zehn Wochen lang rektal appliziert wurde. FFC14A zeigte in der höchsten Dosierung von 13mg/kg die besten Resultate mit einem T/C Wert von 27 % bei 0% Sterblichkeit gegenüber 15% Mortalität in der Kontrollgruppe. Dieses Tumormodell wurde gewählt, weil viele der klinisch relevanten Substanzen hier unwirksam sind. Nur 5-FU in Kombination mit Leukovorin zeigt eine mäßige Wirksamkeit. Es konnte nachgewiesen werden, dass FFC14A aufgrund der transferrinvermittelten Aufnahme in den Tumorzellen eine ausreichend hohe Konzentration erreicht und eine gute wachstumshemmende Wirkung gegen das Kolonkarzinom bei geringer Toxizität hat. Damit liegen präklinisch gute Voraussetzungen für eine klinische Studie vor. (Keppler, Lipponer et al., 1993, Kersten, Bräunlich et al., 1998)

Um die toxischen Nebenwirkungen von FFC14A zu ermitteln, wurden Versuche an NMRI Mäusen, Wister- bzw. Sprague-Dawley-Ratten und Kaninchen durchgeführt. Bei den NMRI

Mäusen betrug die LD₅₀ der Einzelgabe 50mg/kg (2ml physiologischer Kochsalzlösung pro 100g Körpergewicht) und konnte durch Volumenerhöhung des Lösungsmittels (8ml pro 100g Körpergewicht) auf 100mg/kg gesteigert werden. Die Gabe von 50mg/kg in 4ml physiologischer Kochsalzlösung pro 100g Körpergewicht ergab keine Mortalität. In weiteren Untersuchungen der chronischen Toxizität von FFC14A an Sprague-Dawley Ratten konnte ebenfalls keine Mortalität festgestellt werden. Selbst nach Applikation von 13mg/kg FFC14A zwei Mal pro Woche für acht Wochen konnten keine Anzeichen von Toxizität festgestellt werden. Während der Behandlung konnte eine Gewichtszunahme von bis zu 80% in der behandelten Gruppe im Vergleich zu 53% in der Kontrollgruppe gemessen werden. (Keppler, Lipponer et al., 1993) In einer weiteren Toxizitätsuntersuchung an weiblichen Wistar Ratten, die von Kersten und Mitarbeitern (1998) durchgeführt wurde, betrug die LD₅₀ bei intraperitonealer Verabreichung 80mg/kg. Die Verabreichung von FFC14A in therapeutischen Dosen hat keine signifikante Änderung der Nierenfunktionsparameter mit sich gebracht.. Die Verabreichung einer Dosis von 15% der LD₅₀ zwei Mal die Woche fünf Wochen lang führte zu keinen Veränderungen der Nierenfunktion. Nach Verabreichung einer Dosis von 50% der LD₅₀ wurde eine sehr geringe Nephrotoxizität festgestellt. Die Ausscheidung von Wasser und osmotisch wirksamen Substanzen ging auf ca. 40% zurück, während die Proteinausscheidung unverändert und die p-Aminohippursäureausscheidung leicht erhöht war. Weder Ammoniakbildung, Glukoneogenese, renale Lipidperoxidation noch Gluthationstatus waren von *trans*-Natrium-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat (III) beeinflusst.

Abschließend kann man sagen, dass auf Grund erster Anzeichen für FFC14A beim Menschen nephro-, hepato- und myelotoxische Nebenwirkungen zu erwarten sind. Als häufigste hämatologische Nebenwirkung trat eine Anämie neben einer Erhöhung der Kreatininwerte und Leberenzymwerte auf. (Keppler, Lipponer et al., 1993) Untersuchungen von Depenbrock und Mitarbeitern (1997) mit FFC14A und Doxorubicin an humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen zeigten, dass die *in vitro* verursachte Toxizität von FFC14A nach einer Langzeitinkubation ausgeprägter und vergleichbar mit der von Doxorubicin ist. Man sollte also annehmen, dass die antitumorale Aktivität des Komplexes zu hämatologischen Nebenwirkungen bei der klinischen Anwendung führen würde. Allerdings zeigten *In-vivo*-Versuche keine hämatotoxischen Effekte, was darauf basieren könnte, dass eine Anreicherung des Komplexes in den Tumorzellen stattfindet. In keinem der Rattenexperimente konnten Anzeichen für chronische Toxizität nach Verabreichung von FFC14A gefunden werden. Es ist möglich, dass die hämatologischen Effekte durch eine

spezifische Anreicherung des Komplexes in den Tumorzellen durch transferrinvermittelte Aufnahme ausgeglichen werden. (Depenbrock, Schmelcher et al., 1997)

Des Weiteren wurden Untersuchungen der intravenösen, intraarteriellen und paravenösen Applikation in Kaninchen durchgeführt. FFC14A führte zu leichten lokalen Irritationen nach intravenöser und paravenöser und zu mäßigen Irritationen nach intraarterieller Applikation. Es wurden keine geschlechtsspezifischen Unterschiede festgestellt. (Faustus Forschungs Compagnie, 2003)

1.2.7. Klinische Untersuchungen

Zurzeit werden klinische Daten über *trans*-Natrium-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat (III), die in der ersten klinischen Studie 2003/2004 gesammelt wurden, ausgewertet und in dieser Arbeit diskutiert.

1.3. Indazol

1.3.1. Entdeckung

Indazol ist ein aromatischer Heterozyklus, der zu den Benzopyrazolen gehört. Bereits 1880 wurden von E. Fischer die ersten Indazol-Derivate hergestellt. Im Weiteren wurden diese von K. v. Auwers zwischen 1890 und 1930 im Bezug auf die Synthese und die Tautomerie intensiv untersucht. (Houben-Wyel, 1994)

Indazole kommen in der Natur nicht vor, da Organismen keine N,N-Bindung aufbauen können. (Holleman, Wiberg, 2007)

1.3.2. Struktur und chemisches Verhalten

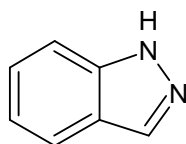


Abbildung 2 1,2-Benzopyrazol

Indazol, dessen systematische Bezeichnung Benzopyrazol lautet, kommt in drei tautomeren Strukturen, als *1H*-, *2H*- und *3H*-Indazol, vor. Ist das Indazol nicht substituiert, so liegt es in fester und gelöster Form hauptsächlich als *1H*-Tautomer vor. Seine Summenformel lautet $C_4H_6N_2$,

woraus sich eine molare Masse von 118,139 g/mol berechnen lässt. Es löst sich schlecht in kaltem Wasser, kann jedoch in heißem Wasser und organischen Lösungsmitteln wie Alkohol und Ether gut in Lösung gebracht werden. Darüber hinaus ist es wasserdampflich. Der Schmelzpunkt von 1H-Indazol liegt zwischen 146-147°C. (Houben-Wyel, 1994)

1.3.3. Anwendung

Es sind diverse Indazolderivate bekannt, die eine pharmazeutische Wirksamkeit aufweisen. Im Jahre 1964 wurde das Benzydamin (1-substituiertes 3-Alkoxy-1H-Indazol), welches analgetische, antipyretische und antiphlogistische Eigenschaften hat, unter dem Handelsnamen Tantum[®] eingeführt. (Houben-Wyel, 1994, Wagner, 1970) Weitere Indazolderivate, wie das Lonidamin, weisen z.B. eine antispermatoogene Wirkung auf. Die 1H-Indazol-Derivate sind sehr vielseitig anwendbar und weisen unter anderem eine pestizide Aktivität, eine bakterizide und fungizide Wirkung auf und können sogar als künstliche Süßstoffe eingesetzt werden. (Houben-Wyel, 1994)

1.4. Proteine

1.4.1. Transferrin

Transferrin gehört zur Gruppe der Siderophilinen. Es ist ein hämfreies, einkettiges Glycoprotein, welches Eisen binden kann und eine molekulare Masse von ca. 77 kDa hat. Es kommt im Blut der Wirbeltiere vor. Seine Verwandten sind das Lactoferrin aus der Milch der Säugetiere und anderer Sekrete des Körpers, sowie das Ovotransferrin, welches im Blut und Eiklar der Vögel vorkommt. Alle Siderophilinen haben die gleiche Fähigkeit zur Eisenbindung und besitzen pro Molekül zwei Bindungsstellen für ein dreifach geladenes Eisenion. Das intensiv untersuchte Transferrin gehört zu den β -Globulinen und ist in 15 genetisch unterschiedliche Varianten aufgeteilt worden. Seine hemmende Wirkung auf das mikrobielle Wachstum wird durch die Bildung von Chelaten mit Eisen zurückgeführt. (Lexikon der Biochemie 2, 2004)

Transferrin ist für den Transport von Eisen im Blut verantwortlich. Unter physiologischen Bedingungen liegt die Sättigung des Transferrins zwischen 20 und 40%. Das an Transferrin gebundene Eisen wird aus dem Blut in die Zelle mittels des Transferrin-Rezeptors eingeschleust. Der Eisen-Transferrin-Rezeptor-Komplex wird in seiner Gesamtheit endocytotisch aufgenommen. Im sauren Milieu des frühen Endosoms wird das Eisen freigesetzt und kann dann weitertransportiert werden. Das nicht mehr mit Eisen beladene Apo-Transferrin bleibt an den Transferrin-Rezeptor gebunden und wird zurück zur Plasmamembran gebracht. Sobald das

Apotransferrin in die neutrale extrazelluläre Umgebung gelangt, dissoziiert es von dem Transferrin-Rezeptor und steht erneut zur Eisenaufnahme zur Verfügung. (Alberts, Johnson et al., 2011, Doenecke, Koolman et al., 2005)

1.4.2. Humanserumalbumin

Das Albumin, auch Serumalbumin genannt, gehört zur Gruppe der Serumproteine und wird in der Leber gebildet. Die Serumproteine zählen zu den Plasmaproteinen, enthalten jedoch kein Fibrinogen und Prothrombin. Im Blutserum ist das Albumin das Hauptprotein (55-62%) und enthält, wie auch das Präalbumin und das retinolbindende Protein, kein Kohlenhydrat. Die relative Molekülmasse (M_r) von Albumin beträgt 67,5 kDa. Es bindet sehr gut Wasser, einige Ionen wie Calcium, Kalium und Natrium, Hormone, Bilirubin, Fettsäuren sowie diverse Pharmaka. Neben der Transportfunktion ist die wichtigste Funktion des Albumins die Einstellung des kolloidosmotischen Drucks im Blut. (Doenecke, Koolman et al., 2005, FEBS, 1977, Lexikon der Biochemie 1, 2004, Lexikon der Biochemie 2, 2004)

1.5. Zielsetzung der klinischen Phase I-Studie von FFC14A

Die klinische Prüfung einer Substanz bis zu ihrer Zulassung als Arzneimittel vollzieht sich in drei Phasen:

Die Phase I ist im Wesentlichen substanzbezogen, das heißt, hier gilt es herauszufinden, wie hoch die beim Menschen maximal tolerable Dosis (MTD) beziehungsweise die dosislimitierende Toxizität (DLT) der Substanz ist und wie ihr pharmakokinetisches Profil aussieht.

In Phase II wird die Substanz indikationsbezogen untersucht, das heißt, mit der in Phase I ermittelten empfohlenen Dosis prüfen die Untersucher die Antitumorwirksamkeit bei einer begrenzten Anzahl von Patienten. Endpunkte sind das Tumoransprechen nach RECIST sowie das progressionsfreie und das Gesamtüberleben.

Hat die Substanz in Phase II Antitumorwirksamkeit erkennen lassen, so folgt in Phase III die patientenbezogene Prüfung. Das heißt, die Substanz wird in einer randomisierten Studie an einer größeren Anzahl von Patienten untersucht. Das Arzneimittel wird mit einer Standardtherapie oder mit einem Placebo mit dem Ziel seiner Zulassung als Therapeutikum verglichen. Die Patientenzahl muss so groß gewählt werden, dass statistisch signifikante Ergebnisse erwartet werden können. (Scheulen, 2012)

Dementsprechend ist die klinische Prüfung von FFC14a in Phase I auf seine Verträglichkeit und

Nebenwirkungen mit Ermittlung von MTD und DLT im Rahmen einer Dosisescalation mit dem Ziel der Ermittlung einer Dosisempfehlung in Form einer „recommended dose“ (RD) für die weitere klinische Untersuchung in Phase II ausgerichtet. (Faustus Forschungs Compagnie, 2003, Krämer, 2003) Zusätzlich sind möglicherweise vorhandene erste Hinweise auf eine antitumorale Wirkung von FFC14A von großem Interesse für die Auswahl der in Phase II zu untersuchenden Tumorentitäten.

Zur Ermittlung von Pharmakokinetik und Metabolismus von FFC14A wurden in der vorliegenden Arbeit zwei geeignete analytische Methoden zur Quantifizierung von Ruthenium und Indazol in Plasma und Ultrafiltrat entwickelt und validiert. Die Bestimmung des Indazols wurde sekundär behandelt und sollte nur Hinweise auf sein mögliches Verhalten nach Applikation im Körper geben. Zusätzlich wurde auch eine Messmethode zur quantitativen Bestimmung von FFC14A im Urin etabliert. Das pharmakokinetische Profil von FFC14A wurde durch die Messung seiner Konzentration zu verschiedenen Zeitpunkten nach intravenöser Verabreichung von FFC14A in Plasma, Ultrafiltrat, Zellen und Urin ermittelt. Mit Hilfe der pharmakokinetischen Parameter wie AUC, Verteilungsvolumen, Halbwertszeit etc. konnten die Patientendaten verglichen, eine Theorie zum möglichen Wirkungsmechanismus von FFC14A entwickelt und das Ausmaß der Nebenwirkungen in Abhängigkeit von der Dosierung ermittelt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien und Reagenzien

Acetonitril	Sigma-Aldrich, 34851
Ammoniumformiat	Fluka Analytical, 09739
Albumin, Human, Fraction V, 96-99%	Sigma-Aldrich, No. A1653-5g
Apo-Transferrin, > 97%	Sigma-Aldrich CAS 11096-37-0
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Sigma Chemical, Lot 99H0095
Indazol HCl	v. Faustus gestellt, produziert durch: Thymoorgan GmbH Pharmazie und Co. KG Schiffgraben 23, D-38690 Vienenburg
Interner Standard	50µl Rh 1000µg/ml + 50µl In 1000µg/ml + 50µl Ir 1000 µg/ml gelöst in 500 ml VL (entspricht je 100µg Rh, In und Ir/L in VL
Indium (In)	Standardlösung 1000µg/ml in Wasser mit verd. (1% HNO ₃), Ultra Scientific Analytical Solutions, Lot G00049
Iridium (Ir)	Standardlösung 1000µg/ml in Wasser mit verdünnter Salzsäure (5% HCl), Ultra Scientific Analytical Solutions, Lot H00286
Methanol	Sigma-Aldrich, No.34860
N-Lauroylsarcosin	Sigma, Lot 112H0128
NaCl 0,9%	Delta Select , 100ml
PBS	Gibco, No. 14190
Platin (Pt)	Standardlösung 1000µg/ml in Wasser mit verdünnter Salzsäure (2% HCl), Ultra Scientific Analytical Solutions, ICP-078, Lot G00443
PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol)	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt

Material und Methoden

Polymorphprep TM	Axis-Shield PoC AS
Proteinkinase K	AppliChem GmbH, 64291 Darmstadt, LOT 8K002013
Rhodlium (Rh)	Standardlösung 1000µg/ml in Wasser mit verdünnter Salzsäure (5%HCl), Ultra Scientific Analytical Solutions, Lot G00536
RNase A (from bovine pancreas)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, LOT 93327420
Ruthenium(Pulver)	v. Faustus gestellt, produziert durch: Thymoorgan GmbH Pharmazie und Co. KG Schiffgraben 23, D-38690 Vienenburg
Ruthenium (Ru)	Standardlösung 1000µg/ml in Wasser mit verdünnter Salzsäure (5%HCl), Ultra Scientific Analytical Solutions, ICP-044, Lot E00266A
65% Salpetersäure (HNO ₃)	Fluka
Stickstoff	
TFA	Fluka, 91703
Triton X-100	Sigma
Trizma [®] Base (Tris[hydroxymethyl]- aminomethan)	Sigma Chemical, LOT 38H5444
Wasser, destilliert	Destillationsanlage

2.1.2. Verbrauchsmaterialien

Centrisart I CUT-OFF 10 000	Sartorius, No. 13239
Probengefäß Flasche G1 braun	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Nr. 300102
Schraubkappe G8 – L	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Nr. 300305
Mikroeinsatz G30	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Nr. 300405

Material und Methoden

Dichtscheibe G8-PTFE	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Nr. 300351
Dichtscheibe G8-Sil/gS	CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe, Nr. 300354
S-Monovette® 10ml 9NC	Sarstedt, Nümbrecht
S-Monovette® 1,4ml 9NC	Sarstedt, Nümbrecht
Filteraufsatz für Flaschen, Nalgene®	Nalge Nunc International Corporation, USA
Pipettenspitzen (0,5 – 5000 µl)	Eppendorf AG, Hamburg
epT.I.P.S. Reloads	
PLG-tubes (Phase Lock Gel 2ml)	5 Prime GmbH, 22767 Hamburg
PP-Test tubes 15 ml , 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, CELLSTAR® Frickenhausen
Cryo`s, PP, 2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Symmetry 300 18µm Trennsäule	Part No.: 54450, Lot Nr.: 013136117/2803, Waters
Symmetry Vorsäule	Part No.: 054225, Lot Nr.: 0216371311, Waters

2.1.3. Geräte

Analysenwaage Typ H-21, Nr. 333.502 (Int.-Nr. WAA 01, TO 38)	Mettler
Analysenwaage Bosch SAE 80/200 (Int.Nr. WAA 04, TO 32)	Göntgen Mess- und Wägetechnik Bot-Kirchhellen
Waage Kern EW 1500-2M (Int.Nr. WAA 06, TO 38)	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Zentrifuge Universal 30 F	Hettich, Mühlheim an der Ruhr
Zentrifuge Rotanta 96 R	Hettich, Mühlheim an der Ruhr
HPLC Anlage Alliance™	Waters
Waters 2695 (Int.Nr. WAT 12)	
Detektor Waters 996	Waters

Photodiode Array Detector

(Int.Nr. WAT 06)

Massenspektrometer micromass ZQ

Waters

ECN 9120292 (Int.Nr. WAT 22)

ICP-MS DDEM-Detektor

Varian

ICP-MS 820

Serial Number EL 07033741 Varian

2.1.4. Arzneimittelzubereitung und Infusionszubehör

Die Wirkstoffmedikation wurde unmittelbar vor der Infusion aus FFC14A und Indazol – HCl an dem jeweiligen Therapietag unter aseptischen Bedingungen hergestellt. Hierzu wurden 50 mg FFC14A in 15 ml isotonischer Kochsalzlösung gelöst und in einen sterilen Behälter überführt. Anschließend wurden 116,5 ml einer Indazol-Hydrochloridlösung hinzugefügt. Vor der Zusammenführung beider Lösungen mussten diese auf Raumtemperatur gebracht werden. Die hergestellte Infusionslösung musste klar und Partikelfrei sein. Sie durfte nicht aufbewahrt und musste sofort verabreicht werden. FFC14A wurde in separaten Gefäßen in Pulverform ausgeliefert und bis zur Herstellung der Infusionslösung in einem Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt. Das Endvolumen der Indazolhydrochloridlösung betrug 116,5 ml und wurde aus 16,95 mg Indazolhydrochlorid und physiologischer Kochsalzlösung hergestellt. Die Infusion erfolgte mit Hilfe einer Infusomat®-Infusionspumpe (B.Braun Medical Care, Melsungen) unter Verwendung eines mit einem in-line-Filter mit 0,22µm Porendurchmesser ausgestattetem Infusionsbesteck. Die Infusionsrate betrug 10ml/min und sollte zum selben Zeitpunkt an jedem Behandlungstag stattfinden.

2.2. Hochleistungs – Flüssigchromatographie

2.2.1. Prinzip der HPLC

Die HPLC (high performance liquid chromatography) gehört zur Gruppe säulenchromatographischer Verfahren, bei denen ein Substanzgemisch unter hohem Druck (>40 bar oder >580 psi; 1 bar = 14,5 psi) in Einzelkomponenten getrennt und qualitativ sowie auch quantitativ analysiert wird. Die Trennung erfolgt unter Einsatz von Pumpen, die das Elutionsmittel (sog. mobile Phase) durch die Trennsäule drücken. Man unterscheidet zwei nicht miteinander mischbare Phasen, die stationäre und die mobile Phase. Die stationäre Phase befindet sich in der Trennsäule und die

mobile Phase transportiert das zu trennende Substanzgemisch über diese hinweg. Die Trennleistung ist sehr stark von der Partikelgröße, -größenverteilung, -material sowie der Porengröße und Oberflächenbeschaffenheit der stationären Phase abhängig. Sie ist umso größer, je kleiner und gleichmäßiger die Teilchen geformt sind. Da dadurch die Packungsdichte ansteigt, kann eine ausreichende Strömungsgeschwindigkeit des Elutionsmittels mit Hilfe von Pumpen erreicht werden. Das Trennungsergebnis hängt neben der stationären Phase auch noch von der Fließmittelzusammensetzung, der Durchflussgeschwindigkeit und dem Substanzgemisch ab. Die Proben werden mit Hilfe eines Autosamplers automatisch aufgegeben und gelangen über das Probeneinlasssystem in den Eluentenstrom, der durch die Trennsäule zu einem Detektor gepumpt wird. In dem Detektor wird ein elektrisches Signal erzeugt, welches dann mit einem speziellen Laborprogramm ausgewertet werden kann. Der stufenlose Lösungsmittelgradient erlaubt es zu jedem Zeitpunkt, das Mischungsverhältnis der Komponenten des Elutionsmittels zu verändern und damit eine optimale Trennung zu erzeugen. Die unterschiedlichen Verweildauern (Retentionszeiten) der Substanzen im Chromatographiesystem resultieren aus deren Wechselwirkung mit der stationären Phase, die nach ihrer Polarität in NP = normale phase und RP = reversed phase unterteilt wird. Bei der Umkehrphasenchromatographie (reversed phase) wird die polare Oberfläche des Trägers durch Umsetzung mit Alkylreagentien (Methylgruppen: RP-2; Octylgruppen RP-8; Octadecylgruppen RP-18) hydrophobiert. Die Retentionszeit erlaubt es, die Substanzen zu charakterisieren und zu identifizieren. Mit ihrer Hilfe und durch die Anwendung bekannter Standardsubstanzen können unbekannte Stoffe bestimmt werden. (Rücker et al., 2008)

Die HPLC hat sich aufgrund ihrer zahlreichen Anwendungsmöglichkeiten und einer hohen Selektivität zu einer am häufigsten angewendeten Trennmethode in der Bestimmung von Arzneistoffen entwickelt. (Rücker et al., 2008)

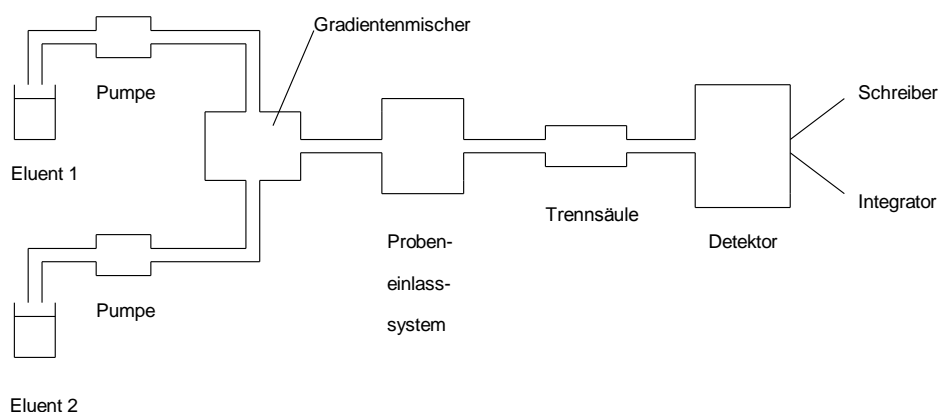


Abbildung 3 Musteraufbau einer HPLC-Anlage (Rücker et al., 2008)

2.2.2. Detektoren

Zur Identifikation der im Eluentengemisch vorhandenen Substanzen werden unterschiedliche Detektoren mit hoher Selektivität eingesetzt und je nach Substanzgemisch ausgewählt. Häufig werden der UV/Vis-Detektor, Fluoreszenzdetektor und Massenselektiver Detektor verwendet. Neben diesen gibt es noch chemische Reaktionsdetektoren, Brechungsindexdetektoren, Leitfähigkeitsdetektoren und elektrochemische Detektoren. (Rücker et al., 2008)

Der UV/Vis-Detektor misst im sichtbaren oder ultravioletten Spektralbereich die Absorption des Lichtes. Für die moderne Analyse von Substanzen werden heute die Mehrkanalphotometer-Detektoren die sog. Photodioden Array-Detektoren (PDA-Detektor) verwendet. Sie können gleichzeitig mehrere Wellenlängen messen und ein vollständiges Absorptionsspektrum der gesuchten Substanz aufzeichnen. Für die Messung stehen 512 Photodioden zur Verfügung und die Arbeitswellenlänge liegt im Bereich von 190 bis 800 nm. Jede Diode misst einen bestimmten Spektralbereich, so dass innerhalb von 0,05 s ein vollständiges Absorptionsspektrum aufgezeichnet werden kann. Durch das Einstellen der Spaltöffnung reguliert man die Bandbreite und die Stärke des Lichtes, welches auf die Photodioden trifft. Der schmale Lichtstrahl wird vom Beugungsgitter reflektiert und fällt auf das Photodioden-Array. Der Reflexionswinkel am Beugungsgitter bestimmt, welche Wellenlänge auf eine bestimmte Diode trifft. Die Lichtmessung erfolgt durch die Messung der Lichtmenge, die auf das Photodioden-Array trifft. Auf diese Weise wird die Absorption einer sich in der Durchflussszelle befindenden Probe gemessen. Die Berechnung der Absorption erfolgt nach dem Lambert-Beerschem Gesetz. Es gibt die „Abhängigkeit der

Absorption von der molaren Konzentration eines Stoffs bei konstanter Schichtdicke wieder“. (PDA-Detektor, Bedienungsanleitung, Rücker et al., 2008)

$$A = \varepsilon(\lambda) \cdot c \cdot b \quad c \text{ in mol} \cdot \text{l}^{-1}$$

A = Absorption

$\varepsilon(\lambda)$ = molarer Absorptionskoeffizient

c = molare Konzentration eines Stoffs

b = konstante Schichtdicke

Der molare Absorptionskoeffizient entspricht der in 1 cm Schichtdicke gemessenen Absorption einer 1-molaren Lösung der zu untersuchenden Substanz. (Rücker et al., 2008)

$$\varepsilon(\lambda) \equiv A_{1\text{cm}}^{1\text{mol}}$$

Da die Angaben der Konzentration meistens in Prozent erfolgen, wird zur Analyse von Arzneistoffen die prozentuale Konzentration in das Lambert-Beersche Gesetz eingesetzt. (Rücker et al., 2008)

$$A = A_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot c \cdot b \quad c \text{ in } \%$$

$$A_{1\text{cm}}^{1\%} = \frac{10 \cdot \varepsilon}{M_r}$$

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$ = spezifische Absorption

Zusammenhang zw. molarer und spezifischer
Absorption

Die spezifische Absorption entspricht bei einer bestimmten Wellenlänge der Absorption einer in 1 cm Schichtdicke gemessenen 1% Lösung. Sie ist eine charakteristische Stoffkonstante und wird zur Identitäts-, Reinheitsprüfung und Bestimmung des Gehalts von Arzneistoffen herangezogen. (Rücker et al., 2008)

Der Fluoreszenzdetektor wird zur Bestimmung von Stoffen benutzt, die zur Fluoreszenz angeregt oder durch Derivatisierung in solche überführt werden können. Er besitzt zwei Filter bzw. Monochromatoren, die für die Anregungs- und die Messwellenlänge genutzt werden. Mit diesem Detektortyp kann man mit hoher Empfindlichkeit sehr spezifisch messen. Um die Fluoreszenz detektieren zu können, sind verschiedenen Komponenten und Prozesse notwendig wie: eine Anregungsquelle, Anregungsfilter, filtrieren des Lichtes, Anregen der Probe mit filtriertem Licht,

Emissionsfilter, das Sammeln und Filtrieren des emittierten Lichtes, Messen der emittierten Fluoreszenz, Fotodiode und Verstärkung des emittierten Signals. (Fluorescence Detector, Operator`s Guide, Meyer, 2004, Rücker et al., 2008)

Das Prinzip der Fluoreszenzmessung basiert auf der Belichtung von Molekülen oder Atomen mit einer Energiequelle z.B. einer Natriumdampflampe oder Xenondampflampe, die ein energiereiches Licht liefert. Durch die Absorption der Lichtenergie gehen die Moleküle bzw. Atome in einen angeregten Zustand über. Wenn sie sich aus dem angeregten Zustand in den Grundzustand bewegen, geben sie einen Teil der absorbierten Energie in Form von Photonen (Fluoreszenz) ab. Die Fluoreszenz der Atome aus verschiedenen Elementen kann trotz der Bestrahlung mit gleicher Quelle unterschiedlich stark ausfallen. Der Fluoreszenzdetektor strahlt die Probe mit einem schmalen Band energiereichen Lichts an und misst die emittierte Fluoreszenz. Das emittierte Licht wird filtriert, verstärkt und in elektrische Signale umgewandelt, die dann analysiert werden können. (Fluorescence Detector, Operator`s Guide, Rücker et al., 2008)

2.2.3. Elutionsmittel und Gradientensystem

In der Pharmazie werden die meisten Trennungen mit Hilfe der Umkehrphasen-Chromatographie durchgeführt. Bei dieser Reversed-Phase-Chromatographie werden sog. RP-Säulen benutzt, die die unpolare Phase darstellen. Der Gegenspieler, die mobile Phase, ist dann polar. Die RP-Säule besitzt poröses Füllmaterial wie Kieselgel oder Al_2O_3 , welches durch die Umsetzung mit Alkylreagentien (z.B. Octadecylgruppen, RP C18-Säulen) hydrophobiert ist. Als mobile Phase werden Methanol-Wasser- oder Acetonitril-Wasser- Mischungen, die zusätzlich mit Pufferlösungen versetzt werden können, eingesetzt. Die Polarität der mobilen Phase kann durch eine variable Zusammensetzung und ständige mengenmäßige Veränderung der einzelnen Komponenten des Elutionsmittels beeinflusst und damit die Löslichkeit der Untersuchungssubstanzen angepasst werden. Um mehrere Analyten voneinander trennen zu können ist es üblich mit einem stufenlosen Lösungsmittelgradienten zu arbeiten, der zu jeder Zeit eine variable Elutionsmittelzusammensetzung erlaubt. Dadurch können die Retentionszeiten beeinflusst und die Analyten getrennt werden. (Rücker et al., 2008) Die folgende Beispielgrafik zeigt die Detektion des Indazols und den dazugehörigen Fließmittelgradienten. (Millenium Software 4.0)

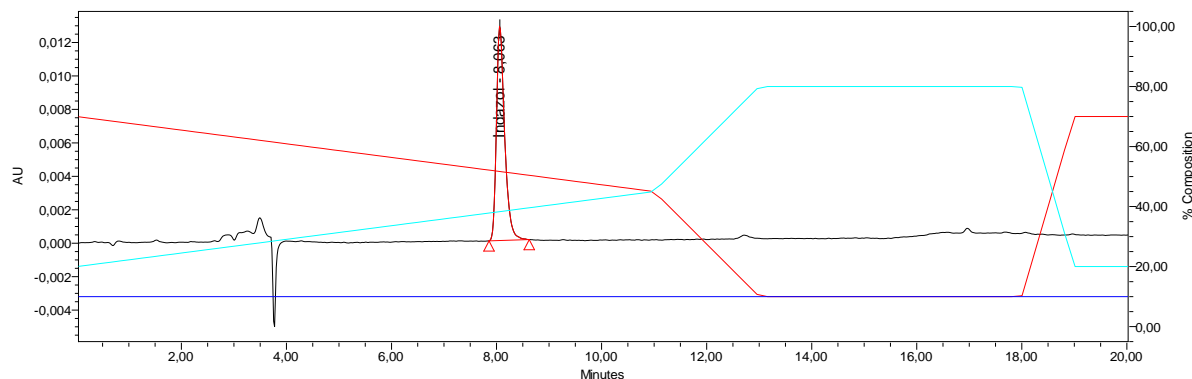


Abbildung 4 Chromatogramm von Indazol mit Gradientenverlauf (Millenium Software 4.0)

Tabelle 1 Zeitlicher Verlauf und Zusammensetzung des Fließmittels (Millenium Software 4.0)

	Zeit [min]	Fluss[ml/min]	Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]	Fließmittel D [%]
1		1,00	70,0	10,0	20,0
2	11,00	1,00	45,0	10,0	45,0
3	13,00	1,00	10,0	10,0	80,0
4	18,00	1,00	10,0	10,0	80,0
5	19,00	1,00	70,0	10,0	20,0

2.3. Analytik von Indazol

2.3.1. Probengewinnung und –lagerung

Die Blutentnahme erfolgte nach einem vorgegebenen Zeitplan und wurde protokolliert (vgl. Kap. 2.8.3). Die Infusion wurde über einen zentralliegenden Port verabreicht und das Blut in Monovetten mit Citrat über eine peripher liegende Venenverweilkanüle entnommen. Im weiteren Verlauf wurden die Blutproben unmittelbar in Eis gekühlt und sofort zu Aufarbeitung ins Labor gebracht, sowie anschließend bei -20° C bzw. – 80° C bis zur Messung eingelagert. Danach wurden aus den Blutproben Plasma, Ultrafiltrat und Zellen gewonnen.

2.3.1.1. Plasmaproben

Um das Plasma zu gewinnen wurde die Citratmonovette mit dem Blut zunächst bei 4°C und 2500g fünf Minuten lang zentrifugiert. Danach wurden jeweils 2x 250 µl des Plasmas in 2ml Cryo.s™ Röhrchen überführt und bei -20°C eingelagert.

2.3.1.2. Ultrafiltratproben

Das Ultrafiltrat wurde aus der Plasmaprobe gewonnen. Dazu wurde das Plasma mittels Centriscat-Filter mit 10000 cut bei 2500g 25 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurden 150 µl des Ultrafiltrats bei – 20°C eingefroren.

2.3.1.3. Urinproben

Die Urinproben wurden aus dem Sammelurin abgefüllt und unverändert bei -20 eingefroren.

2.3.1.4. Zellen

Für die Zellaufarbeitung sind zwei 10ml Citrat-Blut-Röhrchen notwendig. Es wurden in einem 15ml PP-Test-tube 10 ml Blut mit 5 ml Polymorphprep versetzt. Dann wurde das Gemisch bei Raumtemperatur (ca. 24°C) bei 500g 35 Minuten zentrifugiert. Die in der Mitte erschienenen zwei Zellringe wurden mit einer Pipette aufgesammelt und in ein 15 ml PP-Test-tube überführt. Danach wurde mit PBS auf 15 ml aufgefüllt. Durch anschließende Zentrifugation bei Raumtemperatur (ca. 24°C) und 1000g für 5-10 Minuten setzte sich ein Pellet am Boden des Röhrchens ab. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet aufgeklopft und mit 500µl PBS versetzt. Die so gewonnenen Zellen wurden in ein Cryo.s™-Röhrchen überführt und bei – 20°C eingefroren.

2.3.2. Probenaufarbeitung

Plasmaproben wurden nicht gemessen. Es wurden lediglich nur wenige Proben getestet, um zu ermitteln ob Indazol in Plasma messbar ist. Diese wurden aufgetaut und unverändert gemessen. Das Injektionsvolumen betrug 50µl. Ebenso wurden die Urinproben mit der HPLC-Analytik nicht gemessen.

2.3.2.1. Ultrafiltratproben

Die Proben wurden aufgetaut und unverändert gemessen. Das Injektionsvolumen betrug 50µl bzw. 100µl.

2.3.3. Geräteaufbau und Chromatographiebedingungen der HPLC

Die Messungen der Plasma- Ultrafiltrat- und Urinproben erfolgten unter den im Folgenden aufgeführten Bedingungen.

Geräteaufbau:

Pumpe:	Waters 2695
Injector/Probenaufgabesystem:	Waters 2695
Ofen:	Waters 2695
Entgaser:	Waters 2695
Vorsäule:	Symmetry 300 18µm
Trennsäule:	Symmetry 300 18µm
Detektor:	Waters PDA 996
Software:	Millenium/Empower 2

Geräteparameter:

Fließmittel A:	Wasser
Fließmittel B:	0,1 M Ammoniumformiat
Fließmittel C:	Methanol (nicht benutzt), MeOH
Fließmittel D:	Acetonitril, MeCN
Injektionsvolumen:	200µl QC-Proben, 50µl Patientenproben
Durchflussgeschwindigkeit:	1ml/min
Säulentemperatur:	40°C
Probengebertemperatur:	4°C
Gradientensystem:	70/10/20
Detektionswellenlänge:	200nm – 400nm

2.3.4. Kalibrierung

Die Kalibrierlösungen wurden aus einer Stammlösung mit einer Konzentration von 100µg/ml bestehend aus Indazol-HCl und 0,9 % NaCl Lösung hergestellt. Die Konzentrationen der QCS-Proben betrugen 1000ng/ml, 100ng/ml und 10ng/ml. Für die Linearitätsmessung und die Erstellung einer Standardkurve von Indazol wurde aus der o.a. Stammlösung eine Verdünnungsreihe mit folgenden Konzentrationen 1000 ng/ml, 500 ng/ml, 100 ng/ml, 50 ng/ml, 10 ng/ml, 5 ng/ml und 1 ng/ml hergestellt. Die so erstellte Standardkurve wurde für die Messung der Indazol-Ultrafiltratproben als Bezugsgröße genommen.

2.4. ICP-MS

2.4.1. Prinzip der ICP-MS

Erstmals Ende der 1960er Jahre wurde das induktiv gekoppelte Plasma in der Atomemissionsspektrometrie zur Messung von Lösungen genutzt. Diese neu entwickelte Technologie bildete den Anfang eines langjährigen Entwicklungsprozesses, der schließlich in der Spurenanalytik zur Etablierung des ICP-MS Analyseverfahrens führte. 1983 wurden dann die ersten ICP-MS Geräte kommerziell eingesetzt und gewannen seit dem immer mehr an Bedeutung. (Jarvis et al., 1992, Montaser, 1998) Die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-MS: inductively-coupled-plasma mass-spectrometry), gehört zur Gruppe der spektroskopischen Analysenmethoden. Mit einem Massenspektrometer wird die zu bestimmende Substanz ionisiert, d.h. in positiv oder negativ geladene Moleküle oder Atome überführt, die nach ihrer Masse und Ladung getrennt werden. Das Ergebnis wird als ein für die Substanz charakteristisches Massenspektrum dargestellt, aus dem man die Struktur der Substanz aufklären kann. (Budzikiewicz, Schäfer, 2005, Rücker et al., 2008) Die Besonderheit bei ICP-MS ist, dass man mit Hilfe des sehr stark erhitzten Plasmas in sehr kurzer Zeit positiv geladene Ionen nahezu aller Elemente des Periodensystems erzeugen kann. Durch die sehr niedrigen Nachweisgrenzen (im ng Bereich) und geringe Mengen des Probenmaterials hat sich diese Messmethode in der Spurenanalytik etabliert.

Die zu bestimmende Probe ist üblicherweise flüssig und wird in das Probeeingabesystem, welches aus der Sprühkammer (spray chamber) und dem Zerstäuber (nebulizer) besteht, gepumpt. In dem Zerstäubersystem wird die Probe in ein sehr feines Aerosol, welches effektiver ionisiert werden kann, überführt und im Weiteren in den Plasmastrom, der unterschiedlich heiße Zonen aufweist, eingeleitet. Dort wird sie verdampft, atomisiert, ionisiert und weiter in den Analysebereich des induktiv gekoppelten Plasmas, eines im elektromagnetischen Hochfrequenzfeld ionisierten Gases (meistens Argon), welcher 6000-7000K heiß ist und gleichzeitig die Anregungsquelle darstellt, geführt. Es entstehen einfach und mehrfach positiv geladene Ionen sowie auch Molekülionen, die weiter in den Interface-Bereich geleitet werden. Dort werden sie aus dem Bereich des Plasmas, in dem atmosphärischer Druck herrscht, in den Hochvakuumbereich extrahiert. Dieses geschieht mit Hilfe zweier Lochblenden, die als Sampler und Skimmer bezeichnet werden. Von da aus gelangen die Ionen in das Fokussiersystem, die sog. ion optics, die aus negativ geladenen Ionenlinsen besteht. Seine Aufgabe ist es den Ionenstrom aus der Interface-Region in den Massenanalysator,

einen Quadrupol, zu lenken. In dem Massenanalysator, in dem ein Hochvakuum von 10^{-6} bar herrscht, werden die Ionen nach Ihrem Masse-zu-Ladung Verhältnis getrennt. Er besteht aus vier zylindrisch angeordneten Metallstäben, von denen zwei an Gleichstrom und zwei an Radiofrequenz-Spannung angeschlossen sind. Durch die Wahl eines bestimmten Stromes bzw. Spannung, werden nur die zu analysierenden Ionen durch den Quadrupol hindurch geleitet und erreichen das Detektionssystem. Alle anderen Ionen werden aus dem Quadrupol hinausgeschleudert oder kollidieren mit den Stäben und können nicht detektiert werden. (Thomas, Part I-VI, 2001)

Nach Einführung des ICP-MS in den 80-er Jahren waren der channel electron multiplier für niedrige Ionenzählraten und der Faraday cup für hohe Ionenzählraten die gängigen Systeme. Heute wird in den meisten ICP-MS Geräten der discrete dynode electron multiplier (DDEM-Detektor, vgl. Kap. 2.4.2) eingesetzt. Das Grundprinzip eines Detektors beruht auf der Erfassung der Menge der aus einem Massenanalysator heraustretenden Ionen und ihrer Umwandlung in elektrische Impulse, die anschließend gezählt werden. Dabei kann das Auftreffen eines Ions als ein einzelnes Ereignis (Puls-Signal) registriert oder die Summe vieler auftreffender Ionen als Strom gemessen werden (Analog-Signal). Die Stärke der elektrischen Impulse korrespondiert mit der Menge der sich in der Probe befindenden zu analysierenden Ionen. Am Ende wird der Strom als Analog-Signal abgegriffen, elektronisch verstärkt, in ein digitales Signal umgewandelt und an den Auswertungscomputer übertragen. (Thomas, Part VI, 2001)

2.4.2. Detektionssystem

Als Detektor wurde ein discrete dynode electron multiplier (DDEM), der ausschließlich im Pulszählverfahren arbeitet, verwendet. Das Analyt-Ion verlässt den Quadrupol und trifft auf die erste Dynode des DDEM. Hierdurch werden Elektronen freigesetzt, die ihrerseits weitere Dynoden treffen und noch mehr Elektronen generieren. Am Ende der so in Gang gesetzten verstärkten Kaskade wird ein zur Konzentration proportionaler Strompuls erzeugt und gemessen. (Hemester et al., 2012)

2.5. ICP-MS Analytik von Ruthenium

2.5.1. Probengewinnung und -lagerung

Die Blutentnahme, Probengewinnung und -lagerung erfolgte wie in Kap. 2.3.1 beschrieben.

2.5.2. Probenaufarbeitung

Die Proben wurden mit PBS oder einer Verdünnungslösung und internem Standard aufgearbeitet. Die Verdünnungslösung wurde aus 65% Salpetersäure, Triton X-100 und Aqua ad injectabilia gemischt, sodass eine 1% HNO_3 mit 0,05% Triton X-100 Lösung hergestellt wurde.

2.5.2.1. Aufarbeitung von Plasmaproben

Die Proben wurden kurz vor der Messung aufgetaut und weiterverarbeitet.

Das Plasma wurde 1:10000 verdünnt. Zunächst wurden 10 μl Plasma mit 990 μl PBS versetzt. Anschließend wurden 40 μl des verdünnten Plasmas mit 40 μl internen Standards und 3920 μl der Verdünnungslösung gemischt.

2.5.2.2. Aufarbeitung von Ultrafiltratproben

Die wie in Kap. 2.2.1 beschrieben gewonnenen Ultrafiltratproben wurden aufgetaut und für die Messung vorbereitet. Dazu wurden jeweils 100 μl Ultrafiltrat der jeweiligen Patientenprobe mit 100 μl internem Standard versetzt und mit 9800 μl 1% Vol HNO_3 mit 0,05% Vol Triton X-100 aufgefüllt. Der Verdünnungsfaktor betrug hier 1:100.

2.5.2.3. Aufarbeitung von Urinproben

Die Urinproben wurden kurz vor der Messung aufgetaut. 10 μl des Urins wurden mit 100 μl internem Standard und 9890 μl Verdünnungslösung versetzt. Damit ergab sich ein Verdünnungsfaktor von 1:1000.

2.5.2.4. Zellaufarbeitung

Die Zellen wurden wie in Kap. 2.3.1.3 beschrieben vorbereitet.

2.5.2.5. DNA Isolierung

Für die DNA-Isolierung wurden folgende Lösungen hergestellt:

1M Tris-Puffer pH 8:	12,11g Trizma [®] Base mit 50 ml Aqua destilata mischen und mit 5N HCl
N-Lauroylsarcosin:	ad 100 ml Aqua destilata
0,5 M EDTA pH 8:	18,612 g ad 100ml Aqua destillata, mit NaOH Plätzchen den pH-Wert einstellen
RNase :	10 mg in Aqua destillata 15 Minuten lang kochen und langsam abkühlen lassen
Proteinkinase K:	20 mg in 1 ml Aqua destillata lösen
Lysepuffer Endkonzentration:	0,5% Sarkosyl, 1 M EDTA, 5M Trizma [®] Base, 0,5 mg/ml Proteinkinae K; Für ca. 10 ⁸ Zellen 2ml Lysepuffer

Die DNA wurde aus Lymphozyten isoliert. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe des Lysepuffers wurde 1-2h bei 60-65°C inkubiert, anschließend die RNase zugegeben und wieder 1-2 h bei 60-65°C inkubiert. Die PLG-Tubes wurden bei Raumtemperatur und 15000xg für 30sec zentrifugiert. Nach der Inkubation wurde die Lösung in die PLG-tubes überführt und mit gleichem Volumen PCI versetzt anschließend per Hand geschüttelt und 6 Minuten bei Raumtemperatur und 15000xg zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, in 15 ml Tubes überführt und mit 2,5 facher Menge des vorgelegten Volumens 100% eiskalten Ethanol versetzt. Danach fiel die DNA aus. Um die Fällung zu verbessern kann die Probe auch bei -20°C 30 Minuten lang gelagert werden. Das Präzipitat wurde in ein Eppli, in dem 1ml 70% eiskaltes Ethanol vorgelegt war, überführt und 5 Minuten bei 4°C und 10000g zentrifugiert. Danach konnte der Überstand vorsichtig abdekantiert werden und erneut mit 1 ml 70% eiskaltem Ethanol versetzt und wie zuvor zentrifugiert werden. Der Überstand wurde dann an der Luft getrocknet und mit 500µl Aqua injectabilia versetzt. Die Lagerung erfolgte zunächst 1h bei Raumtemperatur und anschließend im Kühlschrank bei 4°C.

2.5.3. Geräteaufbau und Chromatographiebedingungen der ICP-MS

2.5.3.1. Geräteparameter für die Messung von Plasma, Ultrafiltrat und Urin

Analysis Mode:	Analysis Type	Quantitative
----------------	---------------	--------------

Acquisition Mode	Steady state
Scan Mode	Peak Hopping
Spacing	Coarse
Points/Peak	1
Scans/Replicate	15
Replicates/Sample	5

Plasma :	Plasma flow	17,50 L/min
	Auxiliary flow	1,65 L/min
	Sheath Gas Flow	0,20 L/min
	Nebulizer flow	1,00 L/min
	Samplin depth	5,00 mm
	Power	1,40 kW
	Pump rate	5 rpm
	Stabilization delay	30sec

2.5.3.2. Geräteparameter für die Messung von DNA-Addukten

Analysis Mode:	Analysis Type	Quantitativ
	Acquisition Mode	Steady state
	Scan Mode	Peak Hopping
	Spacing	Coarse
	Points/Peak	1
	Scans/Replicate	20
	Replicates/Sample	5

Plasma :	Plasma flow	18,00 L/min
	Auxiliary flow	1,8 L/min
	Sheath Gas Flow	0,18 L/min
	Nebulizer flow	1,00 L/min
	Samplin depth	5,00 mm
	Power	1,40 kW
	Pump rate	5 rpm
	Stabilization delay	30sec

2.5.4. Kalibrierung

2.5.4.1. Herstellung der Standardlösung und der Kalibratoren

Die Kalibrierlösungen wurden aus den gekauften Standardlösungen mit einer Konzentration von 1000µg/ml in zwei Schritten hergestellt. Es wurden je 0,1 ml der Ausgangslösungen (Ir, In, Rh) miteinander gemischt und mit 9,7 ml 1% Vol. HNO₃ mit 0,05% Vol. Triton X 100 versetzt. Dies entsprach einer Konzentration von 10 mg/L. Anschließend wurden 0,1 ml weiter auf 10 ml verdünnt. Damit ergab sich eine Konzentration von 100µg/L.

Verdünnungslösung (VL): 1% HNO₃ mit 0,05% Triton X 100

Interner Standard (IS): 50µl Rh 1000µg/ml + 50µl In 1000µg/ml + 50µl Ir 1000µg/ml in 500ml VL lösen, entspricht je 100µg Rh, In und Ir/L in VL

2.5.4.2. Konzentrationsberechnung – Standardkurve für Plasmaproben

Die Standardkurve mit Ruthenium und Platin wurde in Citratplasma aufgenommen. Die Verdünnungen wurden mit Eigenplasma aus Citrat- Vollblut, welches 15 Minuten lang bei 2100g bei 4°C zentrifugiert wurde, durchgeführt.

Anschließend wurden die Verdünnungsreihen weiter aufgearbeitet. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:10000. Im ersten Schritt wurden jeweils 10µl der Plasmaprobe mit 990µl PBS gemischt und im zweiten Schritt 40µl des verdünnten Plasmas mit 40µl IS versetzt und mit 3920µl Verdünnungslösung (VL) aufgefüllt.

2.5.4.3. Konzentrationsberechnung – Standardkurve für Ultrafiltrat

Die Standardkurve mit Ruthenium und Platin wurde im Ultrafiltrat, welches aus Citrat-Plasma gewonnen wurde, aufgenommen. Weitere Verdünnungen wurden mit Eigenultrafiltrat durchgeführt.

Der Verdünnungsfaktor betrug 1:100. Es wurden jeweils 20µl der Ultrafiltratprobe mit 20 µl internem Standard (IS) gemischt und mit 1960 µl Verdünnungslösung (VL) aufgefüllt.

2.5.4.4. Konzentrationsberechnung – Standardkurve für Urin

Die Standardkurve mit Ruthenium und Platin wurde in Urin aufgenommen. Die Verdünnungen wurden mit Eigenurin durchgeführt.

Anschließend wurden die Verdünnungsreihen Nr. 3 bis Nr. 11 weiter aufgearbeitet. Der Verdünnungsfaktor betrug 1:1000. Es wurden jeweils 10µl der Urinprobe mit 100µl internem Standard (IS) gemischt und mit 9890 µl Verdünnungslösung (VL) aufgefüllt.

2.6. Validierung

Die Analysenmethoden für Ruthenium wurden hinsichtlich Selektivität, Messbereich und Linearität, Stabilität, Wiederfindung, Richtigkeit und Präzision validiert. Dies erfolgte in Übereinstimmung mit der SOP 12 „Validation of Bioanalytical Methods“. (SOP 12, 2003)

2.6.1. Selektivität

Def.: Ist die Fähigkeit einer analytischen Methode in einer Probe den Analyten in der Gegenwart anderer Komponenten, ohne sich gegenseitig zu stören, zu differenzieren und quantifizieren. Zur Bestimmung müssen sechs Leerproben der jeweiligen biologischen Matrix von sechs Quellen bestimmt werden. Jede Probe muss auf Störungen getestet werden, die von endogenen Matrixkomponenten, Metaboliten, Zersetzungsprodukten und der Begleitmedikation herrühren können. (Less et al., 2011, SOP 12, 2003)

2.6.2. Messbereich und Linearität

Messbereich (Def.): Der spezifizierte Messbereich wird in der Regel von Linearitätsstudien abgeleitet und hängt zudem von der beabsichtigten Anwendung ab. Er gilt als validiert, wenn das Prüfverfahren in dem für die spezielle Anwendung interessierenden Bereich linear, präzise und richtig ist. Es sollten folgende Anforderungen erfüllt sein (FDA, Guidance for industry, 2001, Manufacturing & Quality Audit Division, 2004):

- Der niedrigste Wert wird als lower limit of quantification (LLOQ) bezeichnet und sollte im Vergleich zu der Nullprobe ein fünffach höheres Signal geben
- Das Peaksignal für LLOQ sollte getrennt, identifizierbar, reproduzierbar und mit einer Präzision von 20% und Richtigkeit zwischen 80-120% darstellbar sein
- Die Abweichung für den LLOQ-Wert darf bis zu 20% betragen
- Die Abweichung für alle anderen Werte darf 15% nicht übersteigen

Linearität: Die Linearität sollte über den ganzen Meßbereich nachgewiesen werden und beschreibt das proportionale Verhalten zwischen den Messergebnissen und der Konzentration. Dabei kann die Bestimmung des proportionalen Verhältnisses direkt oder durch eine mathematische Umwandlung der Werte erfolgen. Es müssen mindestens fünf verschiedene Konzentrationen, die den Messbereich gleichmäßig abdecken, untersucht werden. Der Nachweis der Linearität erfolgt über eine graphische Auswertung mit Angabe der Regressionsfunktion und des Korrelationskoeffizienten. Von nicht linearen Bezugskurven ist die Kalibrierfunktion anzugeben. (Less et al., 2011, Rücker et al., 2008, SOP 12, 2003, Voß, 2000)

Mit der Linearität wird der proportionale Zusammenhang zwischen der Konzentration des Analyten (x) und dem Messergebnis bewiesen ($y = a + bx$).

a = Achsenabschnitt auf der y-Achse

b = Steigung der Geraden (Regressionskoeffizient)

2.6.3. Stabilität

Unter der Stabilität versteht man die chemische Stabilität eines Analyten in einer gegebenen Matrix unter spezifischen Bedingungen für bestimmte Zeitintervalle. Die Stabilität eines Arzneistoffs in einer biologischen Flüssigkeit wird bestimmt durch die Aufbewahrungsbedingungen, die chemischen Eigenschaften des Arzneistoffs, die Matrix und das Behältersystem. Deshalb sollten die Stabilitätsuntersuchungen das Verhalten des Analyten während des Sammelns und des Verarbeitens der Proben, nach Langzeit- und Kurzzeltaufbewahrungen, nach mehreren Gefrier- und Auftauprozessen, einschließen. Darüber hinaus sollte die Stabilität des Analyten auch in der Stocklösung bewertet werden.

Die Stabilität in % zum jeweiligen Zeitpunkt errechnet sich aus:

$$\text{Stabilität (\%)} = \frac{C_{\text{exp.}}}{C_{\text{ref.}}} * 100$$

Cexp. : Konzentration des Analyten nach sofortiger Vermessung

Cref. : Konzentration des Analyten nach Lagerung unter Versuchsbedingungen oder sonstiger Beeinflussung

Sie gilt als erwiesen, wenn unter den jeweiligen Versuchsbedingungen kein bzw. nur geringfügiger Substanzverlust, bei Berücksichtigung der Messgenauigkeit der Methode, erkennbar war. Ggf.

auftretende Veränderungen müssen bei den Untersuchungen berücksichtigt werden. (FDA, Guidance for industry, 2001, Less et al., 2011, SOP 12, 2003)

2.6.4. Wiederfindung

Die Wiederfindung, auch Wiederfindungsrate WFR genannt, ist ein Maß für den systematischen Fehler und damit für die Richtigkeit eines Analysenverfahrens. Sie beschreibt das Verhältnis zwischen den Istwerten des extrahierten Analyten aus einer Probe und der aus einer realen Probe gefundenen Konzentration. Sie sollte für drei verschiedene Konzentrationen geprüft werden, um Abhängigkeiten (konstant-systematischer oder proportional-systematischer Fehler) zu erkennen.

Die Wiederfindung eines Analyten muss nicht 100 % betragen, sie sollte jedoch konstant, präzise und reproduzierbar sein. (Less et al., 2011, SOP 12, 2003)

2.6.5. Richtigkeit und Präzision

Die **Richtigkeit** des Verfahrens muss über den ganzen Messbereich nachgewiesen werden. Es ist das Ausmaß der Annäherung zwischen dem Mittelwert aus einer großen Serie von Ermittlungsergebnissen und einem anerkannten Bezugswert (Konzentration) des Analyten. Zu ihrer Bestimmung sollten mindestens drei Konzentrationen fünfmal gemessen werden und der Mittelwert nicht mehr als 15 % von dem Sollwert abweichen. Der Wert der niedrigstmöglichen messbaren Konzentration sollte nicht um mehr als 20 % abweichen. Die Abweichung zwischen dem Mittel- und Sollwert (der relative Fehler = rel. Abweichung) dient als Maß der Richtigkeit. (Less et al., 2011, SOP 12, 2003)

$$\text{rel. Abweichung} = \frac{\left| \text{Ist Wert} - \text{richtiger Wert} \right|}{\text{richtiger Wert}} * 100\%$$

Die **Präzision** ist ein Maß für die Streuung, die sich aus zufälligen Fehlern ergibt, von Analyseergebnissen um ihren Mittelwert. Dazu werden wiederholt mehrere Teilproben aus einem einzelnen Volumen einer biologischen Matrix gemessen. Es sollten mindestens drei unterschiedliche Konzentrationen fünfmal bestimmt werden. Die Ungenauigkeit jeder Konzentration, bestimmt als Variationskoeffizient (VK), sollte nicht mehr als 15% abweichen. Die Abweichung für die niedrigste mögliche messbare Konzentration darf nicht mehr als 20 % betragen. Die Präzision hängt ausschließlich von der Verteilung zufälliger Abweichungen ab und

bezieht sich nicht auf den wahren oder den vorgegebenen Wert. Das Präzisionsmaß wird üblicherweise damit ausgedrückt, „wie unpräzise etwas ist“. Es wird als Standardabweichung der Ermittlungsergebnisse errechnet, wobei sich eine geringere Präzision in einer größeren Standardabweichung widerspiegelt. (Less et al., 2011, SOP 12, 2003)

2.6.6. Robustheit und Qualitätskontrolle

Die Robustheit (engl. robustness) stellt die relative Unempfindlichkeit eines Analysenverfahrens gegenüber Änderungen analytischer Randbedingungen dar. Sie beschreibt die Fähigkeit eines Prozesses trotz der Veränderungen präzise und richtige Ergebnisse zu liefern. (Less et al., 2011, Rücker et al., 2008)

Die Ermittlung der Robustheit fand durch die Verwendung unterschiedlicher Chargen der eingesetzten Chromatographiesäulen (Indazolanalytik) bzw. die Bearbeitung durch verschiedene Personen statt.

Mittels Qualitätskontrollen wurde die Systemstabilität überwacht. Dazu wurden die Qualitätsproben im Verlaufe jedes Messdurchgangs in die Analytik eingebaut. Bevor die Patientenproben vermessen wurden, wurden im Vorfeld 4-5 Stammlösungen hergestellt und in Konzentrationen 1, 10, 100, 1000, 10000 ng/ml Ruthenium im Plasma bzw. 10, 100, 1000, 10000 ng/ml Ruthenium im Urin gemessen. Die Kontrolllösungen wurden in 15ml PP-Testtubes zu je 5 ml aliquotiert und in dem Probengeber des Messgerätes bis zur wiederholten Messung aufbewahrt. Vor und nach erfolgter Probenmessung wurden die Qualitätskontrollproben ebenfalls gemessen und die Analyseergebnisse verglichen. Im Falle geringer Abweichungen wurde sowohl die Systemstabilität als auch die Messqualität als gegeben erachtet. (Less et al., 2011, Rücker et al., 2008)

2.7. Pharmakokinetische Methoden

Die im Rahmen einer Untersuchung erhaltenen Patientenproben werden gesammelt und analysiert. Pharmakokinetische Analyse der Daten ermöglicht die Bestimmung individueller Parameter (Cl , $t_{1/2}$, V etc.) und die Erstellung einer kompartmentellen Analyse. Bei der Erarbeitung eines Kompartiment-Modells geht man davon aus, dass sich der Arzneistoff in fiktiven Kompartimenten gleichmäßig im Körper verteilt. Dabei wird zwischen dem zentralen und peripheren Kompartiment unterschieden. Der Wirkstoff kann nur über das zentrale Kompartiment in die peripheren gelangen.

Die Austauschprozesse zwischen den Kompartimenten werden durch Geschwindigkeitskonstanten bestimmt, woraus sich dann charakteristische Kompartimentmodelle erstellen lassen.

In dieser Untersuchung konnte mit Hilfe des Softwareprogrammes Kinetica Version 4.2 ein Zwei-Kompartiment-Modell bestimmt werden. (Jaehde, 2010)

2.7.1. Fitting Parameter

Kinetica ermöglicht die detaillierte Interpretation der erstellten Modelle, sowie Ermittlung der Güte der Anpassung mittels folgender *Godness of Fit* Parameter (Kinetica Version 4.2.0, 2003):

Objective Funktion

Für die objektive Bewertung wird die Summe der Abweichungsquadrate zugrunde gelegt und mit Hilfe der nachfolgenden Formel berechnet:

$$\sum = \frac{(Y_{calc} - Y_{obs})^2}{Weight}$$

Die Anpassung des Modells ist umso besser, je kleiner der ermittelte Wert ist.

The Akaike Criteria (AIC)

Mit dem Akaike Informationskriterium kann ein bestimmtes Modell ausgewählt und bewertet werden. Für die Beurteilung wird die Anpassungsgüte des gewählten Modells, die erhobenen Daten sowie die Anzahl der Parameter, die das Modell beschreiben, herangezogen. Das Maß für die Anpassungsgüte kann als maximale Wahrscheinlichkeit oder als minimale Varianz der Residuen ausgedrückt werden. In Kinetica wird die zweite Ausdrucksmöglichkeit verwendet und in folgender Gleichung ausgedrückt:

$$Akaike = n * \ln \left(\sum_{i=1}^n W_i (Y_{obs_i} - Y_{calc_i})^2 \right) + 2P$$

Daraus ergibt sich, dass je kleiner der AIC-Wert ausfällt, umso besser das Modell zur Beschreibung der Datensätze geeignet ist. (Wikipedia, Informationskriterium, Kinetica Version 4.2.0, 2003)

The Schwartz Criteria

Das beste Modell liegt vor, je kleiner der Schwartz Wert ist.

Schwartz = - Log likelihood + 1/2 Log N

N= Anzahl der Datenpunkte

2.7.2. Pharmakokinetische Parameter

Maximale Plasmakonzentration c_{\max} ist die maximale während der Untersuchung gemessene Konzentration im Plasma nach einmaliger Gabe. (Gugeler, Klotz, 2000, Langer et al., 2011, Langguth et al., 2004, Therasse et al., 2000)

Zeitpunkt der maximalen Konzentration t_{\max} ist die Zeit zwischen Applikation und Erreichen der maximalen Plasmakonzentration. Bei der Gabe identischer Dosen ist t_{\max} umso kleiner und c_{\max} umso größer, je höher die Resorptionsgeschwindigkeit ist. (Gugeler, Klotz, 2000, Langer et al., 2011, Langguth et al., 2004, Therasse et al., 2000)

Die **Clearance (Cl)** ist ein Maß für die Eliminationskapazität. Sie entspricht dem fiktiven Plasmavolumen des vaskulären Kompartiments, das pro Zeiteinheit durch die Prozesse des Metabolismus und der Exkretion vom Arzneistoff befreit wird. Man unterscheidet die renale, hepatische, biliäre Clearance etc. Die totale Körperclearance umfasst die Summe aller Organclearances. (Gugeler, Klotz, 2000, Langer et al., 2011, Langguth et al., 2004, Therasse et al., 2000)

$$Cl_{tot} = Cl_R + Cl_{NR}$$

$$Cl = k \cdot V$$

Cl_R = renale Plasmaclearance

Cl_{NR} = extrarenale Plasmaclearance

Clearance in einem Ein-Kompartiment-Modell

$$Cl = \frac{M}{AUC}$$

$$Cl = \frac{M}{t \cdot c}$$

M = Menge des Arzneistoffs

Clearance modellunabhängig

Die pro Zeiteinheit eliminierte Menge M/t ist zur jeweiligen Plasmakonzentration c proportional. Die totale Clearance lässt sich nach i.v. Gabe einer Einzeldosis allein anhand von Plasmakonzentrationsmessungen ermitteln.

Die **Halbwertszeit** $t_{1/2}$ (Eliminationshalbwertszeit) ist diejenige Zeitspanne, in der die Plasmakonzentration um die Hälfte abgenommen hat. (Gugeler, Klotz, 2000, Langer et al., 2011, Langguth et al., 2004, Therasse et al., 2000)

Für die Abhängigkeit der Halbwertszeit vom Verteilungsvolumen und der Clearance gelten die Beziehungen:

$$t_{1/2} = \ln 2 \cdot \frac{V}{Cl} \qquad t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_{el}}$$

k_{el} = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante

Das „Prinzip der korrespondierenden Flächen“ (nach Dost), besagt, dass unabhängig von der Art der Zufuhr eines Pharmakons die **Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC)** proportional zu der Menge des Arzneistoffs ist, die ins systemische Blut gelangt.

$$AUC = \frac{M}{Cl_{tot}} \qquad AUC = \int_0^{\infty} C(t) dt [\mu g \cdot ml^{-1} h]$$

M = Menge des Arzneistoffs t = time

C(t) = Konzentration

$$AUC(t = 0 \rightarrow \infty) = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n (C_{i-1} + C_i)(t_i - t_{i-1}) + \frac{C_n}{\lambda_z}$$

AUC vom Zeitpunkt der Applikation bis zum Zeitpunkt unendlich.

λ_z = Steigung der Kurve in der terminalen Phase (Extrapolation aus den letzten 3 Messpunkten)

$$AUC_{tot} = AUC_{last} + \frac{C_{last,calc}}{\lambda_z}$$

AUC_{tot} = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von $t = 0$ bis $t = \infty$ mit Extrapolation der terminalen Phase

$$AUC_{last} = \sum_{i=1}^{n-1} \frac{1}{2} \cdot (C_i + C_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)$$

AUC_{last} = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von $t = 0$ bis zu der letzten Konzentration $\geq \text{LLQ}$ (C_{last})

Die **Eliminationsgeschwindigkeit k** beschreibt die Ausscheidung der Gesamtmenge des Arzneistoffs innerhalb eines bestimmten Zeitraums. (Gugeler, Klotz, 2000, Langer et al., 2011, Langguth et al., 2004, Therasse et al., 2000) Die Geschwindigkeit der Elimination (1. Ordnung) wird wie folgt beschrieben:

$$\frac{dA}{dt} = -k \cdot A \qquad A = A_0 \cdot e^{-k \cdot t}$$

A = Menge an Arzneistoff

A_0 = Dosis

k = Eliminationsgeschwindigkeitskonstante 1. Ordnung

Die **mittlere Verweildauer MRT** (Mean Residence Time) entspricht dem Mittel der Verweilzeiten eines unveränderten Arzneistoffmoleküls im Körper. Es ist keine pharmakokinetische Stoffkonstante und beinhaltet alle ADME-Prozesse und die *In-vivo*-Freisetzung aus der Dosierungsform. Die MRT lässt sich aus dem Quotienten zwischen der totalen Verweildauer aller Arzneistoffmoleküle ($AUMC$ = area under the moment curve, Zeit-gewichtete Plasmakonzentrations-Zeit-Kurve) und der totalen Anzahl Arzneistoffmoleküle (AUC) berechnen. Die Größe $AUMC$ wird auch als 1. Kurvenmoment bezeichnet. Es ist definiert als Fläche unter der Momentkurve $t \cdot C(t)$. (Gugeler, Klotz, 2000, Langer et al., 2011, Langguth et al., 2004, Therasse et al., 2000)

$$MRT = \frac{V_{ss}}{Cl_{tot}} = \frac{AUMC}{AUC} = \frac{\int_0^{\infty} C(t) \cdot t \cdot dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \qquad AUMC = \int_0^{\infty} t C(t) dt$$

Verteilungsvolumen V ist kein „reales“ Volumen und wird als scheinbares Verteilungsvolumen bezeichnet. Es ist eine Proportionalitätskonstante, welche die Gesamtmenge des Arzneistoffs zu einer gegebenen Zeit in Beziehung zu der korrespondierenden Plasmakonzentration setzt. (Gugeler, Klotz, 2000, Langer et al., 2011, Langguth et al., 2004, Therasse et al., 2000)

$$V = \frac{A}{C_p} [L \cdot kg^{-1}] \quad V_{ss} = V_1 + V_2 = \left(\frac{k_{12} + k_{21}}{k_{21}} \right) \cdot V_1$$

C_p = Konzentration des Arzneistoffs im Plasma

k_{12} = Verteilungsgeschwindigkeitskonstante ins periphere Kompartiment (vom Kompartiment 1 ins Kompartiment 2)

k_{21} = Rückverteilungsgeschwindigkeitskonstante aus dem peripheren Kompartiment ins zentrale Kompartiment

Man unterscheidet das Verteilungsvolumen im steady state V_{ss} , initiales Verteilungsvolumen $V_{initial}$ und Verteilungsvolumen während der Eliminationsphase V_z gemessen.

$$V_{initial} \leq V_{ss} \leq V_z$$

2.7.3. Angewendete Software

Mit dem Programm Kinetica Version 4.2.0 können umfangreiche Berechnungen und Modellanalysen erstellt werden. Es enthält zahlreiche pharmakokinetische Vorlagen und bietet umfangreiche Analyse-, Simulations- und Protokollierungsmöglichkeiten pharmakokinetischer und pharmakodynamischer Zusammenhänge an. Desweiteren können die Datensätze in verschiedene Microsoft® Windows Anwendungen exportiert werden. (Kinetica Version 4.2.0, 2003)

2.8. Klinische Studie

2.8.1. Studienziele

Die Durchführung der Studie richtete sich nach dem Studienprotokoll des Sponsors und den ICH-GCP Richtlinien und war auf die Ermittlung von Sicherheit und Verträglichkeit von FFC14A ausgerichtet. Das Hauptziel der Studie war die Feststellung der maximal tolerierbaren Dosis (MTD) und der dosislimitierenden Toxizität (DLT) von FFC14A bei Verabreichung als intravenöse Infusions mit dem Ziel der Ermittlung der „recommended dose“ (RD) für weitere Phase II-Studien. (Faustus Forschungs Compagnie, 2003, Stehle, Sinn, Wunder, Schrenk, Stewart et al., 1997)

Des Weiteren sollten qualitativ und quantitativ die toxischen Effekte von FFC14A bezogen auf deren Dauer, Intensität, Zeitpunkt des Ausbruchs sowie die Reversibilität und Dosisabhängigkeit beurteilt werden. Die pharmakologische Evaluation ist sowohl für die Bestimmung der Korrelation zwischen der Toxizität und den Serumspiegeln von FFC14A als auch dessen pharmakokinetischen Profils im Patienten notwendig.

Ein weiteres Ziel war die Bestimmung der Pharmakokinetik der unterschiedlichen Dosen.

Zusätzlich sollte die Wirksamkeit von FFC14A gegenüber malignen Tumoren nach RECIST (Response Evaluation Criteria in Solid Tumours) dokumentiert werden.

Die Patienten mussten vor dem Eintritt in die Studie nach Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung abgeben. (Faustus Forschungs Compagnie, 2003, Therasse et al., 2000)

2.8.2. Studiendesign

Bei dieser Studie handelte es sich um eine offene, nicht-randomisierte, multizentrische Studie mit einem beschleunigten Dosisescalations-Protokoll (vgl. Tab. 2). Die Beschleunigungsphase sollte eingestellt werden, wenn ein Patient die dosislimitierende Toxizität (DLT) oder zwei Patienten eine Toxizität zweiten Grades nach den National Cancer Institute Common Toxicity Criteria (NCI-CTC) während der Behandlung erleiden. Anschließend wurde nach dem modifizierten Fibonacci-Protokoll (vgl. Tabelle 3) verfahren. Die Studie wurde in Deutschland und in Österreich durchgeführt. Es sollten bis zu 30 Patienten mit histologisch oder zytologisch gesicherten soliden Tumoren in fortgeschrittenem Stadium rekrutiert werden. Die aufgenommenen Patienten erhielten unterschiedliche Dosen von FFC14A, angefangen bei 25mg bis die MTD in mehreren Dosierungsschritten, erreicht wurde. Wenn bei den Patienten keine Progression des Tumors eintrat und keine toxischen Nebenwirkungen auftreten, wurden sie wiederholt mit derselben Dosis behandelt. Eine Steigerung der Dosis bei einem und demselben Patienten war nicht möglich. Die Studie wurde bis zum Erreichen der MTD durchgeführt.

Die Patienten wurden mit sechs Infusionen pro Zyklus innerhalb von drei Wochen behandelt. Die Infusionsdauer hing von der Stärke der Dosis ab, da sich mit der höheren Dosis das Infusionsvolumen vergrößerte. Während eines Therapiezyklus wurde ein pharmakokinetisches Monitoring nach strengem Zeitplan durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden bis zu 38 Vollblutproben entnommen und der Urin gesammelt. Gleichzeitig wurden die entnommenen Proben aliquotiert und nach Bonn geschickt, wo sie unter der Aufsicht von Prof. Jaehde mittels flammenloser AAS pharmakokinetisch analysiert wurden. Zwischen zwei Behandlungszyklen mit der gleichen Dosierung mussten 11 behandlungsfreie Beobachtungstage nach der letzten Infusion eingehalten werden.

Tabelle 2 Patientenaufnahme nach beschleunigtem Dosiseskalations-Protokoll

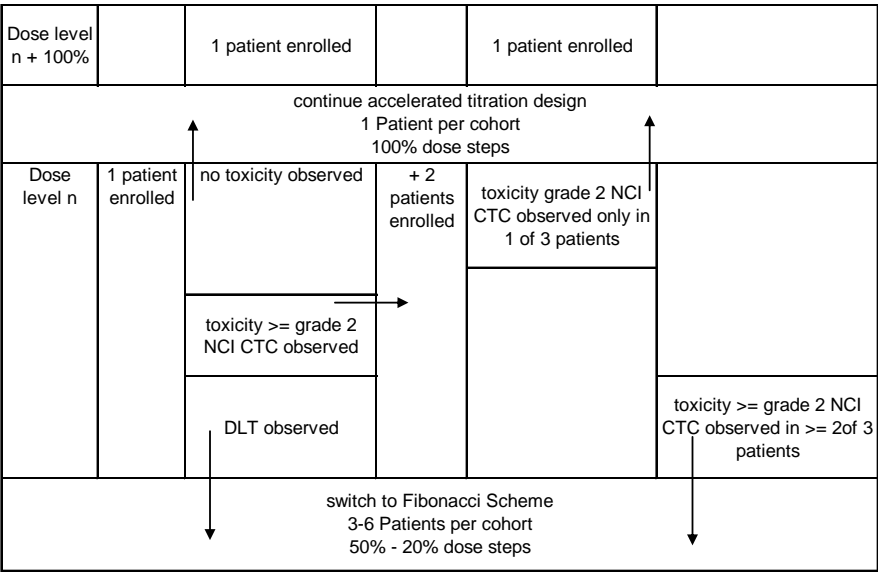
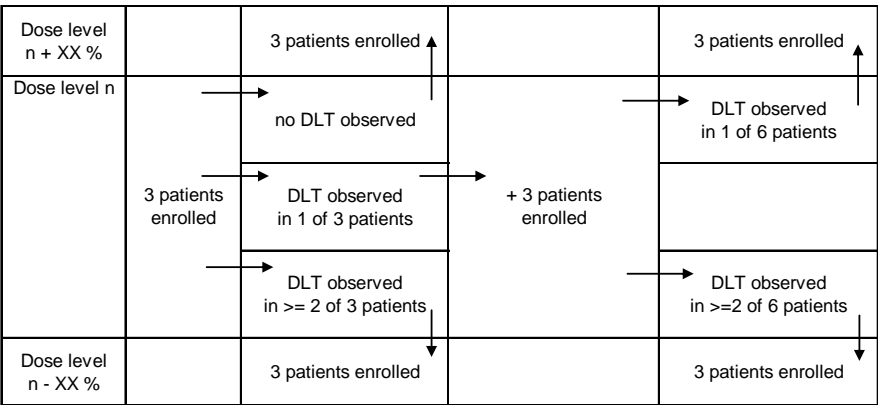


Tabelle 3 Patientenaufnahme nach modifiziertem Fibonacci-Protokoll



2.8.3. Studienprotokoll mit Probenentnahme für die Pharmakokinetik

Die hergestellte Infusionslösung wurde zweimal pro Woche drei Wochen lang über ein Infusionsbesteck mit sterilem Filter verabreicht. Die Infusionsrate betrug 10ml/min.

Pharmakokinetische Auswertungen wurden durchgeführt, da mit ihrer Hilfe eine Korrelation zwischen der Toxizität und der verabreichten Dosis von FFC14A hergestellt werden sollte. Um das pharmakokinetische Profil zu erstellen, wurden Blut- und Urinproben direkt vor, während und nach der Verabreichung der Infusion sowie zwischen zwei aufeinander folgenden Infusionen abgenommen. Pro Patient und Behandlungszyklus wurden jeweils 38 Blutproben mit einem Volumen von je ca. 10 ml entnommen (Tab. 4 und 5).

Tabelle 4 Diagramm des Probenentnahme-Protokolls Tage 1 bis 8

Ablaufdiagramm für die Pharmakokinetik Blutentnahmezeitpunkte																			
	Behandlungstage																		
Tag	1								2		3		4						8
Minuten	dbi		Cmax	20	40	60							dbi		Cmax	20	40	60	dbi
Stunden							2	4	8	24	32	48	56						
Gabe/ Infusion		1												2					3

Tabelle 5 Diagramm des Probenentnahme-Protokolls Tage 11 bis 28

	Behandlungstage																	Nach der Behandlung		
Tag	11		15							16		17		18				26-28		
Minuten	dbi		dbi		0	20	40	60						dbi		0	20	40	60	
Stunden									2	4	8	24	32	48	56					
Gabe/ Infusion		4		5												6				

Die Urinproben wurden direkt vor der Infusion und danach jede Probe separat bis zu 24 Stunden nach der Infusion gesammelt. Der Zeitpunkt und das Volumen der Probe wurden protokolliert.

2.8.4. Klinische Dokumentation

Die Dokumentation umfasste die Bewertung des Tumoransprechens und der Toxizität, einen Fragebogen zur Lebensqualität, Sicherheitsbewertungskriterien, unerwünschte Nebenwirkungen, Elektrokardiogramm sowie biochemische und hämatologische Laborauswertungen.

Die Einstufung der Toxizität erfolgte nach NCI-CTC v2.0. Als TDL wird die minimale Dosis bezeichnet, die zu jeglicher toxischer Erscheinung führt. Die MTD ist definiert als höchste Dosis, die nicht mehr als 33% der DLT beträgt. Sie kann von Patient zu Patient variieren, da sie von Prognosekriterien, dem aktuellen Gesundheitsstatus des Patienten, vorhergehender Therapie, Alter, Krebsart sowie renaler und hepatischer Funktionen abhängt.

Folgende Kriterien definieren die DLT:

- jeglicher NCI CTC Grad ≥ 3 einer nicht-hämatologischen Toxizität (ohne Haarausfall, Übelkeit und Erbrechen mit Besserung nach antiemetischer Behandlung)
- NCI CTC Grad 4, fieberhafte Neutropenie (neutrophile Granulozyten $< 0,5 \times 10^9/L$ und Temperatur $> 38,5^\circ C$ oder klinische Anzeichen einer Infektion)
- NCI CTC Grad 4, Neutropeniedauer ≥ 7 Tage
- NCI CTC Grad ≥ 3 , Thrombozytopenie +/- hämorrhagische Komplikationen

2.8.5. Eingeschlossene Patienten

In die Studie wurden insgesamt 8 Patienten eingeschlossen, die in der folgenden Tabelle aufgeführt sind:

Tabelle 6 Patientenübersicht

Patienten-Nr./ Initialen	Geschlecht	Größe [m]	Alter	KG [kg]	KOF [m ²]	Primäre Diagnose	relevante Neben- diagnosen
FFC 14 A-01 01	w	164	57	78	1,85	Sigma-Ca	Diabetes mellitus Typ II
FFC 14 A-01 02	m	178	66	86	2,04	Rektum-Ca	Angina Pectoris unter 5 FU
FFC 14 A-01 03	M	178	38	80	1,98	Rectum-Ca	Aszites im kleinen Becken
FFC 14 A-01 04	M	164	62	93	1,99	N. vesicae	-
FFC 14 A-01 05	W	166	-	61,5	1,69	-	-
FFC 14 A-01 06	W	168	65	57	1,64	Endometrium- Ca	Tiefe Beinvenen- thrombose, Antrumgastritis
FFC 14 A-01 07	M	167	-	70	1,79	-	-
FFC 14 A-01 08	M	178	-	62	1,77	-	-

2.9. Statistische Methoden

2.9.1. Deskriptive Statistik

Für die Beurteilung der Ergebnisse sind zwei Kenngrößen von hauptsächlicher Bedeutung, nämlich die Lagemaße und die Streuungsmaße. Zu den Ersteren zählen arithmetisches Mittel, Median, Modus und Quantile. Sie beschreiben die zentrale Tendenz einer Häufigkeitsverteilung. Letztere umfassen Spannweite (engl. Range), Varianz, Standardabweichung, Quartilabstand, mittlere absolute Abweichung und beschreiben Streuung oder Dispersion der Verteilung. Im Folgenden sollen die statistischen Parameter, die zur Auswertung der ermittelten Daten benutzt wurden, beschrieben werden (Eckey et al., 2008):

Median \tilde{x} (50%-Trennmarke) teilt die Merkmalswerte in zwei gleich große Hälften. Er besagt, dass mindestens 50% aller Werte kleiner oder gleich und größer oder gleich dem Median sind.

$$\tilde{x} = x_{\left(\frac{n+1}{2}\right)} \quad \text{falls } n \text{ ungerade}$$

$$\tilde{x} = \frac{1}{2} \cdot \left(x_{\left(\frac{n}{2}\right)} + x_{\left(\frac{n}{2}+1\right)} \right) \quad \text{falls } n \text{ gerade}$$

n = Anzahl der Einzelwerte

x_1, \dots, x_n = erzielte Einzelwerte

Arithmetischer Mittelwert \bar{x} stellt im Allgemeinen einen Durchschnittswert dar, bei dem die Merkmalssumme auf die Anzahl der Merkmalsträger bezogen wird.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n x_i = \frac{1}{n} \cdot (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$$

Spannweite R gibt den Bereich, in dem sich alle Einzelwerte befinden, an. Sie berechnet sich als Differenz zwischen dem größten und kleinsten Einzelwert.

$$R = x_{(n)} - x_{(1)}$$

Standardabweichung s weist eine durchschnittliche Abweichung der Merkmalswerte vom arithmetischen Mittel aus und wird als Quadratwurzel der Varianz berechnet.

$$s = \sqrt{s^2}$$

Zur Berechnung der **Varianz** s^2 werden die quadrierten Abweichungen vom arithmetischen Mittel verwendet. Durch die Quadrierung prägen negative und positive Abweichungen gleichermaßen das Ausmaß der Streuung.

$$s^2 = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

Der **Variationskoeffizient** v Variationskoeffizient ist ein relatives Streuungsmaß, welches eine dimensionslose Maßzahl, die prozentual interpretierbar ist, angibt. Er wird als Quotient aus der Standardabweichung s und dem arithmetischen Mittel \bar{x} definiert:

$$v = \frac{s}{\bar{x}}$$

Relativer Fehler f

$$f = \frac{x_a - x_r}{x_r} \cdot 100\%$$

x_r : richtiger Wert der Messgröße

x_a : angezeigter (ausgegebener) Wert

2.9.2. Inferenzstatistik

Typisch für die schließende Statistik ist eine Teil- oder Stichprobenerhebung. Die Aussagen basieren auf der Erhebung eines Teils der Grundgesamtheit, so dass Aussagen über diese getroffen werden, ohne dass alle Elemente dieser Gesamtheit untersucht bzw. erhoben werden. Es werden allgemeine Aussagen und Schlüsse auf die Gesamtpopulation gezogen. Für die Erstellung statistischer Hypothesen wurden entsprechende statistische Tests durchgeführt. Für die Entscheidung zwischen der Nullhypothese (H_0) und der Alternativhypothese (H_1) wird der p-Wert herangezogen. Wenn der p-Wert $\leq \alpha$ (Signifikanzniveau) ist, entscheidet man sich für H_1 . Wird α nicht überschritten, so wird das Testergebnis signifikant genannt. Üblich sind $\alpha = 5\%$ oder $\alpha = 1\%$ als Signifikanzniveaus. Das Ergebnis wurde als statistisch signifikant betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % lag ($p < 0,05$), als sehr signifikant bei $p \leq 0,01$ und bei $p \leq 0,001$ als höchst signifikant. (Bourier, 2009, Diehl, Arbinger, 2001, Nachtigall, Wirtz, 2009)

Student's gepaarter t-Test

Mit diesem Test konnte geprüft werden, ob sich die Mittelwerte von zwei abhängigen Stichproben statistisch signifikant unterscheiden. Voraussetzung ist, dass die Stichproben abhängig sind und die Werte einer Normalverteilung unterliegen.

Wilcoxon Vorzeichen-Rangtest

Dieser Test prüft anhand zweier abhängiger Stichproben die Gleichheit der Mittelwerte der zugrunde liegenden (verbundenen) Grundgesamtheiten. Er berücksichtigt sowohl die Richtung (d.h. das Vorzeichen) als auch die Größe der Messwertdifferenzen zwischen zwei gepaarten Stichproben.

2.9.3. Korrelationsanalyse

Ein statistischer Zusammenhang zwischen zwei quantitativen Merkmalen kann mit Hilfe der Korrelationsanalyse untersucht werden. Die Stärke des Zusammenhangs zwischen diesen wird mit dem Korrelationskoeffizienten nach Bravais und Pearson r gemessen, wobei seine Normierung lautet:

$$-1 \leq r \leq 1$$

Mit r lassen sich nur lineare Zusammenhänge messen. Nimmt der Wert eins an ($r = 1$), so liegen alle verbundenen Beobachtungswerte auf einer Geraden mit positiver Steigung und es liegt eine positive Korrelation vor. Für die maximale negative Korrelation ($r = -1$) gilt, dass alle verbundenen Beobachtungen auf einer Geraden mit negativer Steigung liegen müssen. Liegt eine Unkontrolliertheit ($r = 0$) vor, so sind alle x-Werte oder y-Werte konstant oder es liegt eine kreisförmige Punktwolke bzw. eine parabolische Beziehung vor. Der absolute Wert von r ist umso größer, je näher die Punkte im Streudiagramm an einer steigenden oder fallenden Geraden liegen. (Eckey, 2008)

- $-1 \leq r < -0,8$: Starker negativer Zusammenhang
- $-0,8 \leq r < -0,3$: Mittlerer negativer Zusammenhang
- $-0,3 \leq r < -0,1$: Schwacher negativer Zusammenhang
- $-0,1 \leq r \leq 0,1$: Kein Zusammenhang
- $0,1 < r \leq 0,3$: Schwacher positiver Zusammenhang

- $0,3 < r \leq 0,8$: Mittlerer positiver Zusammenhang
- $0,8 < r \leq 1$: Starker positiver Zusammenhang

2.9.4. Regressionsanalyse

Um die Regressionsanalyse durchführen zu können, muss zunächst festgestellt werden, welche Variable abhängig bzw. unabhängig ist. Die abhängige Variable wird mit Y (Regressand) und die unabhängige Variable mit X (Regressor) bezeichnet. Im Falle einer linearen Regression wird unterstellt, dass die Variable X die Variable Y linear beeinflusst. Damit ergibt sich folgende Gleichung (Eckey, 2008):

$$y = a + b \cdot x$$

a und b: Regressionskoeffizienten

b: Steigungsparameter

a: absolutes Glied, Ordinatenabschnitt der Regressionsgleichung

x: unabhängige Variable

Determinationskoeffizient (Bestimmtheitsmaß) R^2 ist ein Maß zur Beurteilung der Güte der Anpassung der Regression und lässt sich prozentual interpretieren. Der Wertebereich des Determinationskoeffizienten lautet:

$$0 \leq R^2 \leq 1$$

Darüber hinaus besteht zwischen dem Determinationskoeffizienten und dem Korrelationskoeffizienten nach Bravais und Pearson folgender Zusammenhang:

$$R^2 = r^2$$

Er lässt sich durch die Quadrierung von r bilden und ergibt einen absoluten Wert, der aussagekräftig ist.

3. Ergebnisse

3.1. Bioanalytische Bestimmungsmethoden

3.1.1. ICP MS Analytik von Ruthenium

Zur Bestimmung der Ruthenium-Ionen-Konzentration in Plasma, Ultrafiltrat und Urin wurde das ICP 820 MS Gerät der Firma Varian mit einem DDEM-Detektor verwendet. Jede Probe konnte in wenigen Minuten gemessen werden, so dass nicht nur eine sehr genaue, sondern auch sehr effektive Analysenmethode etabliert wurde. Vor der Messung der Patientenproben wurde das Gerät gespült, eine Leerprobe gemessen und anschließend bei unauffälligen Ergebnissen die Standards vermessen. Danach wurden mindestens sechs Spülvorgänge vorgenommen und die Patientenproben gemessen. Nach Vermessung der Patientenproben wurden wiederholt mehrere Spülungen vorgenommen und die Standards zur Kontrolle der Messgenauigkeit gemessen. Zusammen mit den zur Kontrolle durchgeführten Nachmessungen konnte festgestellt werden, dass in dem Konzentrationsbereich zwischen 0,01 µg/L und 10 µg/L genau und zuverlässig gemessen werden konnte. Neben den Rhodium-, Indium- und Iridium-Ionen, die als Standardsubstanzen verwendet wurden, wurden noch Silber- und Platin-Ionen gemessen. Da einige Patienten vorher noch eine Behandlung mit Platinmetallen, z.B. Oxaliplatin auf Grund einer FOLFOX Therapie erhalten hatten, sollte festgestellt werden, ob messbare und aussagekräftige Konzentrationen von Platin detektiert werden konnten.

3.1.2. HPLC Analytik von Indazol

Zur Bestimmung der Konzentration von Indazol wurden zunächst Untersuchungen in Plasma durchgeführt. Es sollte festgestellt werden, ob im Plasma zuverlässige Messergebnisse erzielt werden könnten. Hierzu wurde Indazol in 0,9% NaCl gelöst und anschließend mit Plasma verdünnt. Da das Plasma unverdünnt zu erheblichen Störungen im System führte, wurde aus den angefertigten Konzentrationslösungen, 50 µg/ml, 1 µg/ml und 5 ng/ml, Ultrafiltrat gewonnen und jeweils 200 µl gemessen. Die Retentionszeit lag bei ca. 8 Minuten. Die Konzentration 5 ng/ml konnte nicht immer zuverlässig detektiert werden, 10 ng/ml konnten zuverlässig gemessen werden, so dass der LLOQ auf 10 ng/ml festgesetzt wurde. Dennoch gab es weiterhin deutliche Schwankungen bei der Messung der unteren Konzentrationen, deren Abweichung zwischen 20-40 % lag. Die Wiederfindungsrate lag bei ca. 20%. Aus diesen Gründen wurden die QC-Proben nicht mehr im Plasma, sondern in 0,9% NaCl-Lösung hergestellt und mit der Instrument-Methode

"Ru_Ind_PDA" gemessen und ausgewertet. Durch die Wahl der NaCl-Lösung als Matrix konnte bewiesen werden, dass eine valide Bestimmung des Gehaltes, nach Vorschriften der SOP12 (2003), von Indazol durchgeführt werden konnte. Durch verschiedene im Plasma stattfindende Phänomene, deren Ursprung nicht geklärt werden konnte, war die Durchführung einer zuverlässigen Validierung im Ultrafiltrat nur eingeschränkt möglich. Da Indazol im Rahmen dieser Arbeit nur zu Kontrollzwecken gemessen und keine toxischen Effekte erwartet und festgestellt wurden, ist auf eine weitere Entwicklung einer genaueren Analytik von Indazol verzichtet worden. Anderenfalls hätte die untere Messgrenze auf einen Wert erhöht werden müssen, der immer zuverlässig gemessen werden könnte.

3.2. Validierung

3.2.1. Validierung der Analytik von Ruthenium im Plasma und Ultrafiltrat

3.2.1.1. Selektivität

Die Ermittlung der Selektivität konnte durch die sehr spezielle Analysenmethode des ICP-MS Systems verkürzt werden. Jede Probe wurde fünfmal gemessen und jede Wiederholungsmessung 15mal gescannt. Darüber hinaus wurden den QC Proben drei interne Standards, Rh103, In115 und Ir193, zugefügt, mit deren Hilfe eine Wechselwirkung mit anderen Ionen bei der Messung der Rutheniumionen ausgeschlossen werden konnte. Die Leerproben wurden nach dem in Kapitel 2.5.2 beschriebenen Protokoll hergestellt und gemessen. Es wurden keine Störungen festgestellt. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Messung zwischen einer Leerprobe (Blank), einer Standardprobe und einem Spülvorgang zu sehen.

Tabelle 7 Untersuchung der Selektivität im Ultrafiltrat

Sample Label	Ru99 Mean c/s	Ru101 Mean c/s	Ru102 Mean c/s	Ru... Mean c/s
Spülen 1	43,20	39,60	238,16	320,96
Blank	36,00	41,00	285,65	362,65
Standard 1,0µg/L	74195,60	104250,80	199220,30	377666,70

3.2.1.2. Messbereich und Linearität

Die Festlegung des Messbereiches für die Messung von Ruthenium wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden Konzentrationen im Ultrafiltrat und Plasma sowie der ermittelten Selektivität auf 0,001 - 1,0 µg/L im Ultrafiltrat und 0,001 – 10,0 µg/L im Plasma vorgenommen.

In der Messung der Kalibrierlösungen konnte ein linearer Zusammenhang sowohl im Plasma als auch im Ultrafiltrat bewiesen werden Abb. 5 und 6). Der dazugehörige Determinationskoeffizient lag bei 0,998 für Messungen im Ultrafiltrat und bei 1,0 im Plasma. Alle Messwerte, die für die Erstellung der Kalibrierkurven verwendet wurden, sind in den Tabellen 8 und 9 dargestellt.

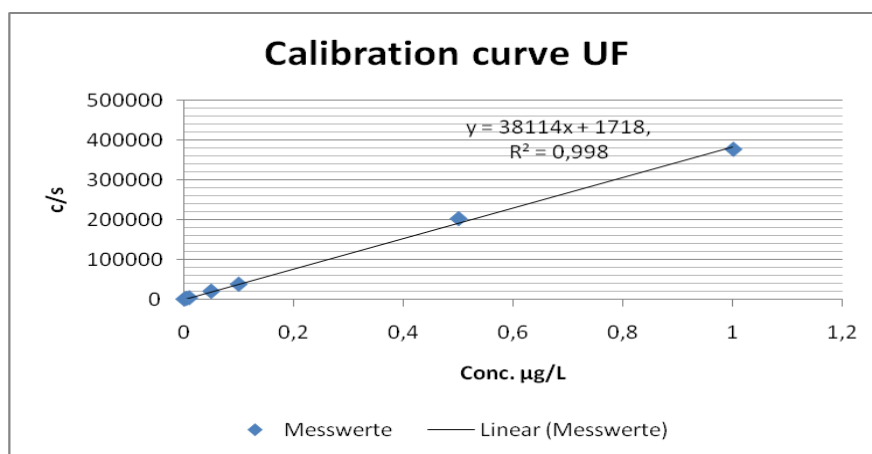


Abbildung 5 Kalibriergrade im Ultrafiltrat

Tabelle 8 Linearitätsmessungen im Ultrafiltrat

Sample Label	Ru... ug/L ppb	Ru... c/s	Std. Conc.	Calc. Conc.	Abweichung [%]
Blank	0	363	0,0000	-0,0001	
Standard 0,001µg/L	0,001	794	0,0010	0,0010	0,83
Standard 0,005µg/L	0,005	2423	0,0050	0,0051	2,88
Standard 0,01µg/L	0,01	4245	0,0100	0,0098	-2,27
Standard 0,05µg/L	0,05	20557	0,0500	0,0512	2,40
Standard 0,1µg/L	0,1	38272	0,1000	0,0962	-3,81
Standard 0,5µg/L	0,5	203052	0,5000	0,5147	2,93
Standard 1,0µg/L	1,0	377667	1,0000	0,9581	-4,19

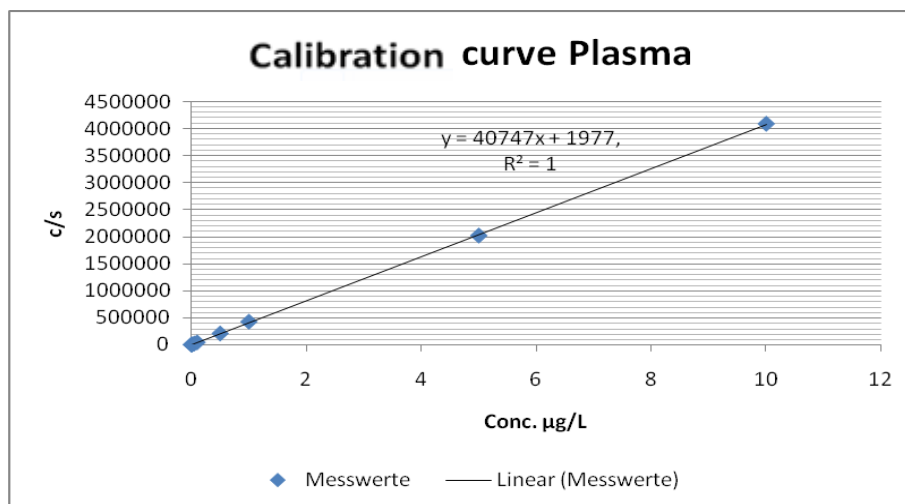


Abbildung 6 Kalibriergrade im Plasma

Tabelle 9 Linearitätsmessungen im Plasma

Sample Label	Ru... ug/L ppb	Ru... c/s	Std. Conc.	Calc. Conc.	Abweichung [%]
Blank	0	404	0,0000	0,0000	
Standard 0,001µg/L	0,001	797	0,0010	0,0010	-2,45
Standard 0,005µg/L	0,005	2486	0,0050	0,0051	1,04
Standard 0,01µg/L	0,01	4485	0,0100	0,0099	-1,23
Standard 0,05µg/L	0,05	21239	0,0500	0,0503	0,62
Standard 0,1µg/L	0,1	43453	0,1000	0,1039	3,92
Standard 0,5µg/L	0,5	207031	0,5000	0,4987	-0,26
Standard 1,0µg/L	1,0	425342	1,0000	1,0256	2,56
Standard 5,0µg/L	5,0	2018408	5,0000	4,8703	-2,59
Standard 10,0µg/L	10,0	4085572	10,0000	9,8592	-1,41

3.2.1.3. Stabilität

Auf genauere Untersuchungen der Stabilität wurde verzichtet, da mit der Analysenmethode des ICP-MS jegliche Verbindung atomisiert wird und nur die Rutheniumionen gemessen werden.

3.2.1.4. Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate (WFR) wurde sowohl für Ultrafiltrat als auch für Plasma bestimmt. Im Ultrafiltrat lagen die Schwankungen bei bis zu +10% und -0,12 %. Im Idealfall sollte die WFR 100% betragen. Die in der folgenden Tabelle dargestellte WFR überschreitet weder die +/- 10% noch lässt sie einen systematischen Fehler erkennen.

Tabelle 10 Wiederfindungsrate (WFR) im Ultrafiltrat

Sample lable	Ru99 ug/L ppb	Ru101 ug/L ppb	Ru102 ug/L ppb	Ru... ug/L ppb	Soll Wert Ru...,µg/L	IST Wert Ru...µg/L	WFR in %
QC Standard 0,001µg/L	0,0009	0,0012	0,0007	0,0009	0,001	0,0009	90
QC Standard 0,005µg/L	0,0052	0,0053	0,0047	0,005	0,005	0,0050	100
QC Standard 0,01µg/L	0,0095	0,0097	0,009	0,0093	0,010	0,0093	93
QC Standard 0,05µg/L	0,05	0,0504	0,0503	0,0498	0,050	0,0498	99,6
QC Standard 0,1µg/L	0,0949	0,0947	0,0938	0,0933	0,100	0,0933	93,3
QC Standard 0,5µg/L	0,5058	0,5039	0,5067	0,5006	0,500	0,5006	100,12
QC Standard 1,0µg/L	0,9487	0,9436	0,9432	0,9347	1,000	0,9347	93,47

Die Wiederfindungsrate im Plasma liegt für alle Werte bis auf die Konzentration von 0,001 µg/L innerhalb der +/- 10% Grenze.

Tabelle 11 Wiederfindung (WFR) in Plasma

Sample lable	Ru99 ug/L ppb	Ru101 ug/L ppb	Ru102 ug/L ppb	Ru... ug/L ppb	Soll Wert Ru...,µg/L	IST Wert Ru...µg/L	WFR in %
QC Probe 0.001µg/L	0,0014	0,0015	0,0013	0,0014	0,001	0,0014	140
QC Probe 0.010µg/L	0,0099	0,0102	0,0098	0,0099	0,010	0,0099	99
QC Probe 0.100µg/L	0,1032	0,1044	0,1025	0,1031	0,100	0,1031	103,1
QC Probe 1.000µg/L	1,0369	1,0491	1,0185	1,0299	1,000	1,0299	102,99
QC Probe 10.00µg/L	9,4353	9,5344	9,2743	9,3716	10,000	9,3716	93,716

Grundsätzlich lässt sich kein Hinweis auf einen systematischen Fehler erkennen. Die 40% Abweichung für den niedrigsten Wert scheint eine einmalige Messungenauigkeit zu sein, da die Präzisions- und Richtigkeitsauswertungen innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen lagen (vgl. Kap.3.2.1.6).

3.2.1.5. Robustheit und Qualitätskontrolle

Die Robustheit des gesamten Systems wurde durch Einsatz verschiedener Personen bei der Herstellung der Standardlösungen und Aufarbeitung der Patientenproben und Messung der Proben an verschiedenen Tagen bewiesen. Die Qualitätskontrolle erfolgte durch die Vermessung der QC-Proben vor und nach jeder Messreihe der Patientenproben. Die Schwankungen lagen bei +/- 10% incl. des LLQ.

3.2.1.6. Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit wurde für fünf verschiedene Konzentrationen ermittelt. Hierzu wurden die Mittelwerte aus n=5 Messungen ermittelt und die dazugehörigen SD und RSD-Werte und die relative Abweichung errechnet. Sie lag bei der niedrigsten Konzentration (LLOQ) unter 11% und bei den übrigen Konzentrationen bis 7%. Eine Messreihe wurde auf Grund eines gemessenen LLOQ Wertes von 40% ausgeschlossen, so dass für die Auswertung n=4 Messungen herangezogen wurden. Dennoch konnte die Richtigkeit für das angewandte analytische Verfahren durchgeführt werden:

Tabelle 12 Richtigkeit im Plasma

Sample Label	Ru... Mean c/s	SD	RSD	Soll Konz.	Kalkulierte Konz. Ges.	rel. Abweichung
Standard 0,001µg/L	699	82,49	11,80%	0,0010	0,0010	0,00%
Standard 0,01µg/L	4297	115,66	2,69%	0,0100	0,0101	1,00%
Standard 0,1µg/L	41747	1309,53	3,13%	0,1000	0,1027	2,70%
Standard 1,0µg/L	417025	8734,17	2,09%	1,0000	1,0335	3,35%
Standard 10,0µg/L	3972414	155526,32	3,91%	10,0000	9,9632	-0,36%

Ergebnisse

Ähnliche Ergebnisse konnten für die Ermittlung der Richtigkeit im Ultrafiltrat (n=3 Messungen) erzielt werden. Dort lag die relative Abweichung für den LLOQ (0,001µg/L) unter 1% und für den höchsten Wert (1,0µg/L) bei -6,30 %. Alle anderen prozentualen Fehler lagen unter -7 %.

Tabelle 13 Richtigkeit im Ultrafiltrat

Sample Label	Ru... Mean c/s	SD	RSD	Soll Konz.	Kalkulierte Konz. Ges.	rel. Abweichung
Standard 0,001µg/L	771	27,18	3,52%	0,0010	0,0010	0,00%
Standard 0,01µg/L	4068	163,98	4,03%	0,0100	0,0094	-6,00%
Standard 0,1µg/L	37284	924,83	2,48%	0,1000	0,0937	-6,30%
Standard 1,0µg/L	370287	6655,58	1,79%	1,0000	0,9394	-6,06%

Die Präzision wurde für fünf verschiedene Konzentrationen ermittelt und durchgeführt. Hierzu wurden fünf Proben hergestellt und statistisch ausgewertet. Die ermittelte relative Standardabweichung erfüllte für alle Konzentrationsbereiche die vorgegebenen Validierungskriterien. Der niedrigste Wert (LLOQ) lag unter 5 %, alle anderen Werte sogar unter 3 %. Damit wurden die Vorgaben, dass sie RSD für den LLOQ bei max. 20 % und für alle übrigen RSD- Werte bei max. 15 % liegen darf, erfüllt.

Tabelle 14 Präzision im Plasma

Sample Label	Ru... Mean c/s	Ru... Mean c/s	Ru... Mean c/s	Ru... Mean c/s	Ru... Mean c/s	Mittel- wert	SD	RSD
Stand. 0,001µg/L	585	637	643	656	665	637	31,16	4,90%
Stand. 0,01µg/L	4137	4102	4216	4247	4350	4210	97,46	2,32%
Stand. 0,1µg/L	38723	39788	39860	40360	40238	39794	645,93	1,62%
Stand. 1,0µg/L	394930	399397	402572	409871	406726	402699	5893,45	1,46%
Stand. 10,0µg/L	3906387	3997370	4047379	4029865	4130201	4022240	81219,03	2,02%

In der nachfolgenden Tabelle ist die Präzision im Ultrafiltrat dargestellt. Sie wurde für vier verschiedene Konzentrationen, die jeweils fünfmal gemessen wurden, bestimmt. Alle Werte liegen

in den vorgegebenen Validierungskriterien. Der LLOQ Wert übersteigt nicht die vorgeschriebenen 15 %. Die übrigen Werte liegen unter 2%.

Tabelle 15 Präzision im Ultrafiltrat

Sample Label	Ru... Mean c/s	Ru... Mean c/s	Ru... Mean c/s	Ru... Mean c/s	Ru... Mean c/s	Mittel- wert	SD	RSD
Stand. 0,001µg/L	799	852	745	791	784	794	38,40	4,83%
Stand. 0,01µg/L	4209	4294	4273	4161	4290	4245	58,23	1,37%
Stand. 0,1µg/L	37316	37927	38583	38799	38735	38272	636,75	1,66%
Stand. 1,0µg/L	370895	373650	380625	382496	380667	377667	5076,05	1,34%

3.2.2. Validierung der Analytik von Ruthenium in Urin

3.2.2.1. Selektivität

Um die Selektivität zu bestimmen, wurden zehn Urin-Leerproben gemessen und auf Störsignale geprüft. Die Urin-Leerproben wurden, wie bereits in Kapitel 2.5.4.3 beschrieben, aufgearbeitet. Jede Probe wurde mit internem Standard, Rh103, In115, Ir193 versetzt. Vor der Messung der Urin-Leerproben wurde nochmals gespült und anschließend eine Leerprobe (Blank), einer 1% HNO₃ Lösung mit 0,05% Triton X 100, gemessen. Es wurden keine relevanten Störpeaks detektiert. In der nachfolgenden Tabelle sind die Messergebnisse dargestellt:

Tabelle 16 Selektivität im Urin

Sample Label	Ru101 Mean c/s	Soln Conc [µg/L]	Ru99 Mean c/s	Soln Conc [µg/L]	Ru102 Mean c/s	Soln Conc [µg/L]
Spülen 1	120,20	0,0007	141,00	0,0007	305,39	0,0007
Blank	64,60	0,0003	91,60	0,0001	175,73	0,0002
Urin Leerprobe 01	88,60	0,0005	98,80	0,0002	214,51	0,0003
Urin Leerprobe 02	38,60	0,0001	72,00	-0,0001	143,39	0,0000
Urin Leerprobe 03	40,00	0,0001	70,60	-0,0001	147,37	0,0001
Urin Leerprobe 04	42,20	0,0001	68,00	-0,0001	142,18	0,0000
Urin Leerprobe 05	49,60	0,0002	69,60	-0,0001	150,87	0,0001
Urin Leerprobe 06	46,60	0,0001	73,20	-0,0001	165,17	0,0001
Urin Leerprobe 07	43,60	0,0001	72,40	-0,0001	149,16	0,0001
Urin Leerprobe 08	37,40	0,0001	73,80	-0,0001	128,14	0,0000
Urin Leerprobe 09	38,80	0,0001	68,00	-0,0001	125,64	0,0000
Urin Leerprobe 10	40,40	0,0001	80,60	0,0000	145,45	0,0001

3.2.2.2. Messbereich und Linearität

Der Messbereich wurde in Abhängigkeit der zu erwartenden Konzentrationen im Urin sowie der ermittelten Selektivität auf 0,005 - 10,0 µg/L festgelegt.

Tabelle 17 Linearitätsmessung im Urin

Sample Label	Ru102 c/s	Std. Conc.	Calc. Conc.	Abweichung [%]
Blank	132	0,0000	0,0000	
Standard 0,005µg/L	1396	0,0050	0,0052	4,37
Standard 0,01µg/L	2753	0,0100	0,0108	8,23
Standard 0,1µg/L	25004	0,1000	0,1027	2,71
Standard 1,0µg/L	232917	1,0000	0,9613	-3,87
Standard 10,0µg/L	2422581	10,0000	10,0038	0,04

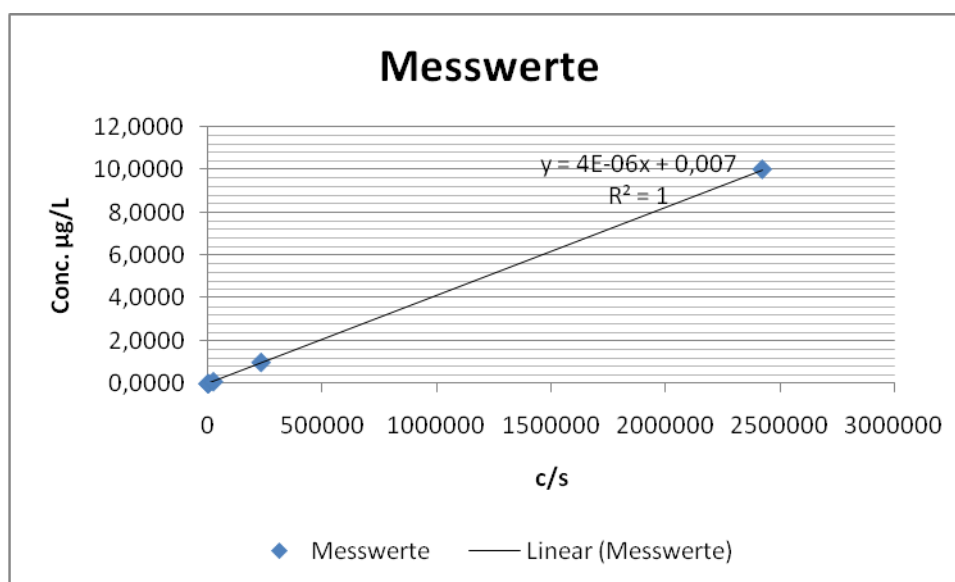


Abbildung 7 Kalibriergrade im Urin

Der lineare Zusammenhang im Urin konnte durch die Messung der Standardlösungen bewiesen werden. Der dazugehörige Determinationskoeffizient lag bei 1,0. Alle Messwerte, die für die Erstellung der Kalibrierkurven verwendet wurden, sind in der o.a. Tabellen dargestellt.

3.2.2.3. Stabilität

Stabilitätsuntersuchungen wurden nicht durchgeführt, da die besondere Analysenmethode mit ICP-MS dies nicht erforderte.

3.2.2.4. Wiederfindung

Die ermittelten prozentualen Werte für die Wiederfindungsrate lagen innerhalb der +/- 10% Grenze. Es konnten keine systematischen Fehler festgestellt werden. In der unten aufgeführten Tabelle sind die Werte für vier Konzentrationsbereiche dargestellt.

Tabelle 18 Wiederfindung (WFR) im Urin

Sample Label	Ru99 ug/L	Ru101 ug/L	Ru102 ug/L	Ru... ug/L	Soll Wert Ru...µg/L	IST Wert Ru...µg/L	WFR in %
QC Probe 0.010µg/L	0,0107	0,0107	0,0108	0,011	0,010	0,011	110
QC Probe 0.100µg/L	0,0976	0,0974	0,0978	0,1001	0,100	0,1001	100,1
QC Probe 1.000µg/L	1,0183	1,0184	1,0165	1,0427	1,000	1,0427	104,27
QC Probe 10.00µg/L	10,2692	10,2182	10,2035	10,4746	10,000	10,4746	104,746

3.2.2.5. Robustheit und Qualitätskontrolle

Die Robustheit und Qualitätskontrolle wurde wie in Kapitel 3.2.1.5 beschrieben durchgeführt. Die Schwankungen lagen bei +/- 5%, im Bereich des LLOQ bei 10%.

3.2.2.6. Richtigkeit und Präzision

Die Richtigkeit wurde durch die Berechnung der Mittelwerte für 0,01, 0,1, 1,0 und 10,0 µg/L und der entsprechenden relativen Abweichung ermittelt. Als Referenzwerte wurden die Nominalkonzentrationen verwendet. Der relative Fehler, in Prozent ausgedrückt, lag an der Nachweisgrenze (LLOQ) bei 2,0% und bei allen weiteren Konzentrationen unter 5%. Damit wurden die Validierungskriterien, die eine Abweichung von max. 20% am LLOQ und max. 15% an allen anderen Konzentrationen erlauben, erfüllt.

Tabelle 19 Richtigkeit im Urin

Sample Label	Ru102 Mean [c/s]	Soll Konz. [µg/L]	Kalkulierte Konz. [µg/L]	rel. Abweichung
Standard 0,0100 µg/L	2474	0,0100	0,0103	3,00%
Standard 0,1000 µg/L	20189	0,1000	0,0992	-0,80%
Standard 1,0000 µg/L	205849	1,0000	1,0211	2,11%
Standard 10,0000 µg/L	2099921	10,0000	10,1013	1,01%

Die Präzision wurde durch fünffache Messung vier verschiedener Konzentrationen bestimmt. In der nachfolgenden Tabelle sind die einzelnen Messwerte erfasst sowie die dazugehörige relative Standardabweichung aufgeführt. Der Variationskoeffizient liegt an der Nachweisgrenze unter 2 % und an allen weiteren Konzentrationen unter 1%. Mit diesen Werten erfüllt die analytische Methode die vorgegebenen Validierungskriterien.

Tabelle 20 Präzision im Urin

Sample Label	Ru102 Mean c/s	Ru102 c/s	Ru102 c/s	Ru102 c/s	Ru102 c/s	Ru102 c/s	Soll Konz. [µg/L]	Kalk. Konz. [µg/L]	RSD
Standard 0,0100 µg/L	2753	2692	2743	2818	2738	2775	0,0100	0,0108	1,69%
Standard 0,1000 µg/L	25004	24951	25384	24838	25036	24810	0,1000	0,1027	0,92%
Standard 1,0000 µg/L	232917	233204	232106	232922	233831	232523	1,0000	0,9613	0,28%
Standard 10,0000 µg/L	2422581	2420179	2429114	2422437	2408451	2432724	10,0000	10,0038	0,39%

3.2.3. Validierung der Analytik von Indazol in NaCl und Plasma

3.2.3.1. Selektivität

Die Selektivität wurde sowohl im Plasma als auch Natriumchloridlösung untersucht. Probemessungen im Plasma und im Ultrafiltrat führten zu keinen stabilen Ergebnissen in der Bestimmung der Selektivität. Es ergaben sich Abweichungen in den unteren

Ergebnisse

Konzentrationsbereichen, die zwischen + 20 und + 40 % lagen (vgl. Kap.3.1.2). Sie scheinen von der Plasmazusammensetzung des jeweiligen Spenders abzuhängen und konnten abschließend nicht geklärt werden. Aus diesem Grund wurde für die Validierung 0,9% NaCl Lösung als Matrix gewählt. Die jeweiligen Messungen zeigten eine störpeakfreie Basislinie. Im folgenden Diagramm ist zum einen die Basislinie der NaCl Lösung in grün dargestellt, die nur ein Grundrauschen zeigt, und zum anderen als Vergleich die Konzentrationen 50 ng/ml (schwarz), 5 ng/ml (rot) und 1 ng/ml (blau). Indazol kann selektiv detektiert werden.

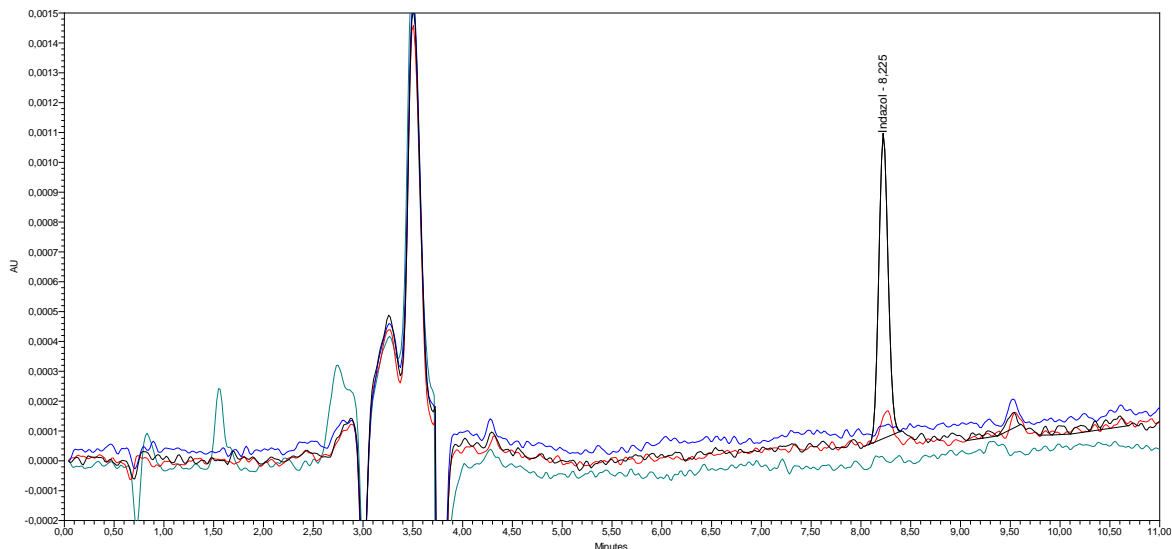


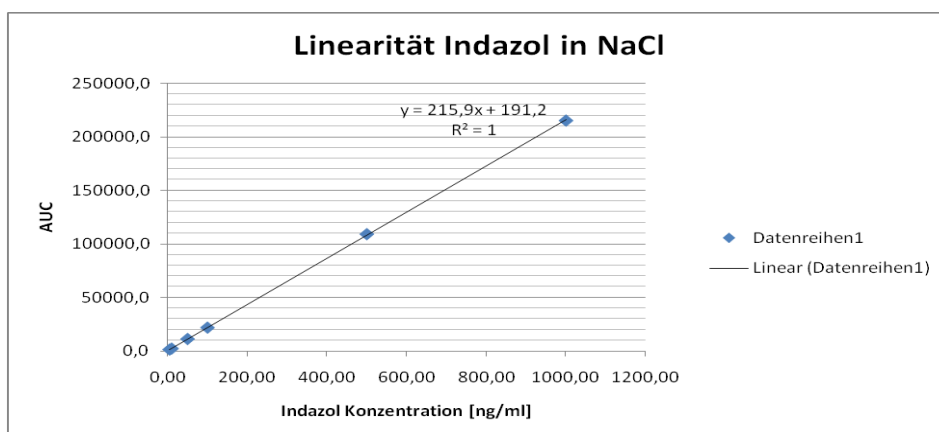
Abbildung 8 Darstellung der Selektivität (Linie: schwarz 50 ng/ml, rot 5 ng/ml, blau 1 ng/ml, grün NaCl)

3.2.3.2. Messbereich und Linearität

Der Messbereich in NaCl wurde auf 5,0 ng/ml – 1000,0 ng/ml festgelegt. Im Ultrafiltrat konnten unter 10,0 ng/ml keine konstanten, zuverlässigen und aussagekräftigen Messungen durchgeführt werden. Die Messung einer Konzentration über 1000 ng/ml im Plasma wurde nicht für wahrscheinlich angenommen, so dass die oberste Grenze auf 1000 ng/ml festgesetzt wurde.

Tabelle 21 Linearität Indazol in NaCl 0,9%

Indazol [ng/ml]	Area	Kalkulierter Wert [ng/ml]	rel. Abweichung [%]
5,0000	1134,189882	5,2459	4,91
10,0000	2036,506341	9,4194	-5,81
50,0000	11013,974856	50,9427	1,89
100,0000	21680,904900	100,2802	0,28
500,0000	109202,912035	505,0935	1,02
1000,0000	215637,467888	997,3827	-0,26

**Abbildung 9** Kalibriergrade in NaCl 0,9%

Bei der Messung der Standardlösungen konnte ein linearer Zusammenhang zwischen AUP und der dazugehörigen Indazolkonzentration bewiesen werden. Der Determinationskoeffizient betrug $R^2 = 1$.

3.2.3.3. Stabilität und Wiederfindung

Stabilitätsuntersuchungen wurden in NaCl-Lösung, filtrierter NaCl-Lösung und Plasma durchgeführt. Die Filtration sowohl von NaCl als auch von Plasma wurde in Centrisart Filtrationsröhrchen mit einem cut off 10.000 durchgeführt. Nach der Filtration von NaCl wurden

Verluste bis zu 25% und von Plasma bis zu 80 % bestimmt. Alle Messwerte sind in der folgenden Tabelle aufgeführt.

Tabelle 22 Wiederfindungsbestimmung von Indazol

Indazol [ng/ml]	AUP NaCl	AUP NaCl filtr.	AUP Plasma	% von NaCl NaCl filtr.	% von NaCl Plasma
5,0000	722	535	171	74,100	31,963
10,0000	1232	1033	309	83,847	25,081
50,0000	6712	5175	1552	77,101	23,123
100,0000	14013	10289	2904	73,425	20,724
500,0000	68774	52519	16027	76,365	23,304
1000,0000	139808	106140	30454	75,918	21,783

3.2.3.4. Richtigkeit und Präzision

Die Präzision wurde für fünf verschiedene Konzentrationen ermittelt. Alle Proben wurden jeweils sechsmal gemessen und ausgewertet. Die berechnete relative Standardabweichung erfüllte die vorgegebenen Kriterien für die Validierung. Der LLOQ- Wert lag unter 9,0%, alle anderen Werte unter 6% und 1%.

Tabelle 23 Präzision von Indazol in NaCl

Indazol [ng/ml]	IST Konz. [ng/ml]	IST Konz. [ng/ml]	IST Konz. [ng/ml]	IST Konz. [ng/ml]	IST Konz. [ng/ml]	Mittelwert [ng/ml]	SD	RSD %
5000,00	4991,5	4994,7	5001,5	4944,7	4998,3	4986,1	23,5	0,47
500,00	492,3	496,1	492,9	492,1	495,5	493,8	1,9	0,38
100,00	99,2	98,1	97,9	97,9	97,7	98,2	0,6	0,61
10,00	10,0	9,1	9,5	10,5	9,7	9,8	0,5	5,40
5,00	5,0	4,3	5,4	5,0	4,6	4,9	0,4	8,68

Die Richtigkeit wurde für die niedrigste, die mittlere und die höchste Konzentration ermittelt. Für ihre Berechnung wurde der Mittelwert aus fünf Messwerten gebildet und die relative Abweichung in % ausgerechnet. Alle Messwerte erfüllten die vorgeschriebenen Validierungskriterien und überschritten nicht 20% am LLOQ bzw. 15 % an allen anderen Konzentrationen.

Tabelle 24 Richtigkeit von Indazol in NaCl

Indazol [ng/ml]	Soll Konz. [ng/ml]	Kalkulierte Konz. [ng/ml]	rel. Abweichung in %
1000,00	1000,00	945,64	-5,44
100,00	100,00	92,64	-7,36
10,00	10,00	9,78	-2,20

3.2.3.5. Robustheit und Qualitätskontrolle

Eine Vielzahl von Vergleichsmessungen in 0,9% Kochsalzlösung und Plasma zeigte, dass die Validierung in Plasma äußerst schwierig ist und zu keinen stabilen Ergebnissen führt. Alles Weitere wurde wie in Kap.3.2.1.5 beschrieben durchgeführt.

3.3. DNA-Analytik

Die Doppelstrang-Desoxyribonukleinsäure (dsDNA) wurde zum einen photometrisch und zum anderen mittels ICP-MS gemessen. Mit der photometrischen Bestimmungsmethode konnte die Absorption, Ratio, Reinheitsgrad und dsDNA-Gehalt gemessen werden.

Mit der ICP-MS Methode wurde das an die DNA gebundene Rutheniumion gemessen. Auf eine vollständige Validierung wurde verzichtet, da nur eine ergänzende Information bzgl. der Wechselwirkung zwischen DNA und FFC14A von Interesse war. Die Probe wurde mit 2% HNO₃ Lösung zwecks leichter Bestimmung der DNA versetzt. Es wurden eine Standardkurve, Richtigkeit und Präzision sowie zur Kontrolle Qualitätskontrollproben durchgeführt. Die Richtigkeit wurde für die Konzentrationen 1,0 ng/L, 10,0 ng/L und 100 ng/L durchgeführt. Für den niedrigsten Wert LLOQ (1,0 ng/L) wurde die relative Abweichung in Höhe von 14,27%, für die mittlere Konzentration ein Wert in Höhe von 3,37% und für die oberste Grenze ein Wert in Höhe von 2,22% bestimmt. Alle Messwerte erfüllten die Validierungskriterien der SOP 12 (2003). Die für jede Dosis ermittelten Werte für das Rutheniumion lagen zwischen 4 ng/L und 74 ng/L.

3.4. Pharmakokinetische Datenanalyse

3.4.1. Pharmakokinetische Parameter und Modellfitting von Ruthenium

Im Anschluss an die quantitative Analytik von Ruthenium und Indazol erfolgte die pharmakokinetische Auswertung der Daten. In der pharmakokinetischen Phase durchläuft der Arzneistoff verschiedene Prozesse, wie Resorption, Verteilung und Elimination. Die Analyse dieser Prozesse ist essentiell bei der Erstellung adäquater Modellsysteme für die zu prüfende Substanz. Dabei werden die Konzentrations-Zeit-Verläufe der Arzneistoffe aus entsprechenden mathematischen Gesetzmäßigkeiten und Gleichungen errechnet und passende Modelle erstellt. In der Praxis unterscheidet man zwischen linearer Kinetik, in der die Konzentration der verabreichten Dosis proportional ist, und nichtlinearer Kinetik, die deutlich seltener vorkommt. Die verschiedenen pharmakokinetischen Modelle setzen sich aus einem oder mehreren Verteilungsräumen, den sog. Kompartimenten, zusammen. Man spricht dann von Ein-, Zwei- und Mehrkompartiment-Modellen. (Gugeler, Klotz, 2000, Mutschler et al., 2008)

Im Einkompartiment-Modell verteilt sich nach Verabreichung der Arzneistoff unmittelbar und gleichmäßig im gesamten zugänglichen Kompartiment. In Mehrkompartiment-Modellen erfolgt die Verteilung des Arzneistoffs in verschiedene Kompartimente mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, bis ein Gleichgewicht der Verteilungsprozesse erreicht wird. (Mutschler et al., 2008)

Ruthenium wurde parallel in zwei weiteren Instituten (Universität Bonn, Prof. Dr. Ulrich Jaehde und Universität Wien, Prof. Dr. Bernhard K. Keppler) untersucht. Dabei hat man festgestellt, dass die Pharmakokinetik einem Zwei-Kompartiment-Modell mit einer niedrigen Clearance, einem kleinen Verteilungsvolumen und einer langen Halbwertszeit entspricht. Es wurde eine hohe Bindungsaktivität an Serumproteine, insbesondere Albumin (> 99%) und Transferrin (< 1%) beobachtet, was darauf schließen lässt, dass das Blut das zentrale Kompartiment ist.

In Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Plasmabindung als auch die absolute Konzentration von Ruthenium untersucht und gemessen. Für die Ermittlung der Plasmabindung und die Bestätigung der Bindungsaktivität von Ruthenium an Proteine, wurden die Citratproben von Patient P08 (600 mg), nachdem c_{\max} erreicht wurde, näher untersucht. An dieser Stelle sollen nur die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt werden. Auf die Analytik soll nicht näher eingegangen werden, da die Bestimmung der Bindungsaktivität nicht das zentrale Thema dieser Arbeit ist. Die Proteine wurden mit RP-HPLC Methode getrennt und einem PDA Detektor bei 280 nm gemessen. Die Fraktionen wurden einzeln aufgefangen und anschließend mit ICP-MS Methode der Rutheniumgehalt gemessen. Um sicherzustellen, dass apo-Transferrin und Albumin mit dieser

Methode getrennt werden können, wurde ein Protein-Standard Mix analysiert, der bestätigt hatte, dass beide Proteine zuverlässig getrennt und gemessen werden können. Anschließend wurde das Citratplasma von Patient P08 analysiert. Beide Proteine konnten ebenfalls getrennt dargestellt werden. Die Fraktionen mit apo-Transferrin (RT = 16,5 min.) und Albumin (RT = 17,7 min.) wurden separat aufgefangen und mit ICP-MS gemessen. Wie die nachstehende Abbildung zeigt, wurde kein, an apo-Transferrin gebundenes Ruthenium, gemessen. Ruthenium, als Balken dargestellt, war größtenteils an Albumin gebunden.

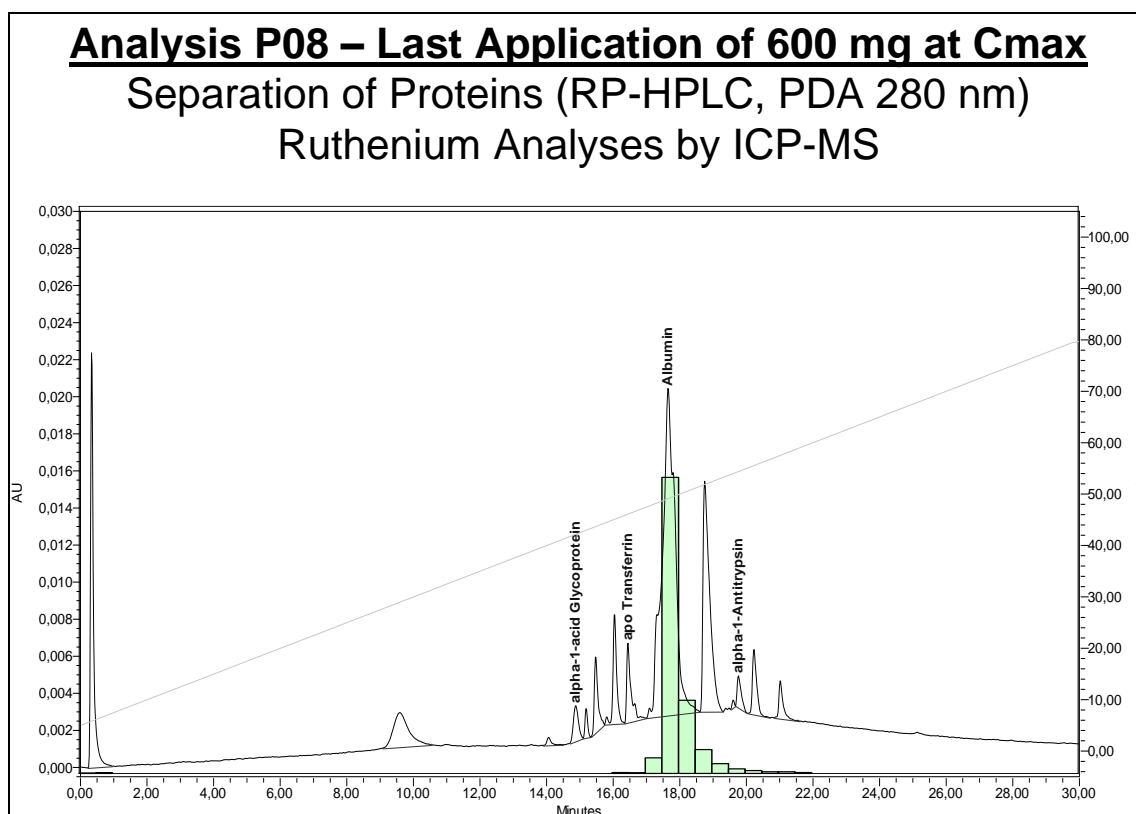


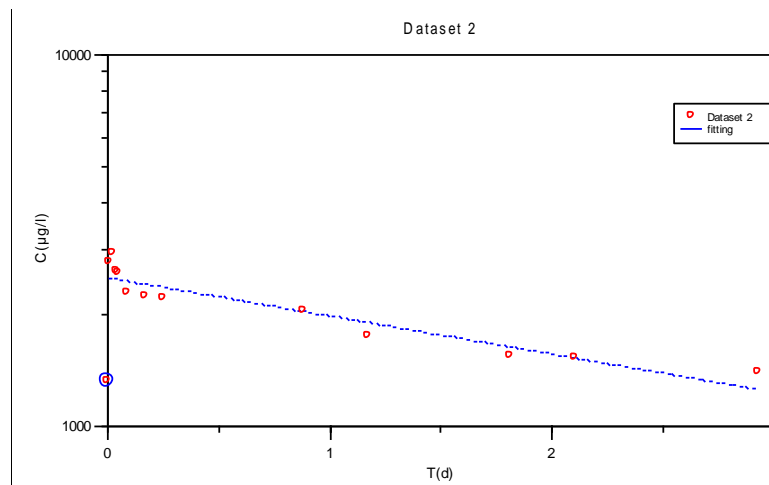
Abbildung 10 Proteinfractionierung und anschließende Rutheniumbestimmung

Mit Hilfe der Kinetica 4.2 Software wurde eine Modellfindungsanalyse durchgeführt. Hierzu wurden die Plasmakonzentrations-Zeit-Verläufe und die dazugehörigen Fittingparameter verglichen, um ein adäquates Modell zu erstellen. Als Wichtung der einzelnen Datenpunkte wurde $1/Y_{\text{pred}}^2$ ($Y_{\text{calc}} \cdot Y_{\text{calc}}$) gewählt. Anschließend wurden die Ein- und Zwei-Kompartiment-Modelle unter Berücksichtigung der Verläufe der Kurven, der berechneten objektiven Funktion, der Akaike- und Schwartz-Kriterien und der Standardabweichung miteinander verglichen. Die niedrigsten Akaike- und Schwartz-Kriterien konnten mit einem Ein-Kompartiment-Modell erzielt werden und sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 25 Kriterien des Modellfittings

	Patient 1 (25mg)				Patient 8 (600mg)			
	1.Gabe		5.Gabe		1.Gabe		5.Gabe	
Modell	Akaike-Kriterium	Schwartz-Kriterium	Akaike-Kriterium	Schwartz-Kriterium	Akaike-Kriterium	Schwartz-Kriterium	Akaike-Kriterium	Schwartz-Kriterium
1-Kompartiment	-16,79	-18,39	-26,26	-27,78	-16,82	-18,33	-42,30	-43,90
2-Kompartiment	-20,95	-24,16	-41,85	-44,88	-24,24	-27,63	-39,08	-42,29

Trotz der niedrigeren Werte musste durch die Analyse der entsprechenden grafischen Kurvenverläufe das Ein-Kompartiment-Modell verworfen und das Zwei-Kompartiment Modell gewählt werden. Wie die unten aufgeführten Grafiken zeigen, entsprechen die Konzentrations-Zeit-Verläufe einem Zwei-Kompartiment-Modell.

**Abbildung 11** Patient 1, Ein-Kompartiment-Modell, 5. Gabe

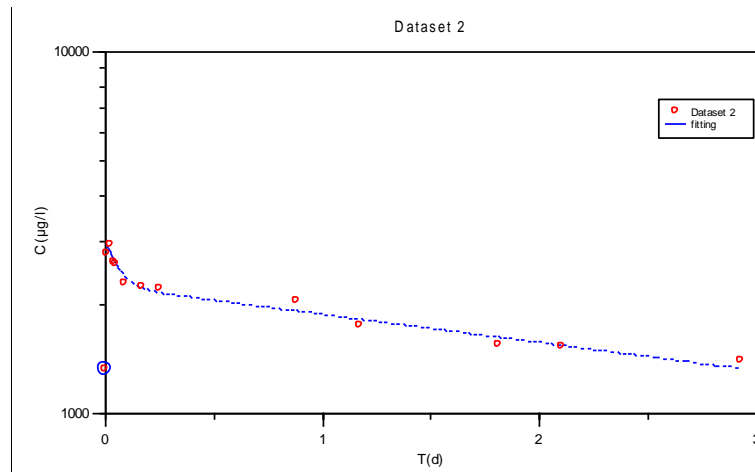


Abbildung 12 Patient 1, Zwei-Kompartiment-Modell, 5. Gabe

Die Auswertung der Pharmakokinetik von Ruthenium erfolgte ausschließlich mit der Software Kinetica Version 4.2 und Excel 2007. Da sich bei der Rutheniumstudie um eine Dosisfindungsstudie handelte, wurde pro Dosis immer nur ein Patient rekrutiert, so dass keine Vergleichsdaten für eine bestimmte Konzentration vorliegen. Sobald ein Patient in seiner Erkrankung progredient wurde, musste er aus der Studie ausgeschlossen werden und ein weiterer Patient für dieselbe Dosis aufgenommen werden. Für die Dosis 50 mg und 600 mg musste je ein weiterer Patient in die Studie eingeschlossen werden, da die Vorgänger ausgeschieden sind. Ab einer Konzentration von 400 mg mussten auf Grund von Inkompatibilitäten mit dem Infusionsbesteck und begrenzter Stabilität der fertigen Zubereitung die Infusionslösungen auf 200 mg pro Zubereitung begrenzt werden. Somit hat der Patient mit einer 400 mg Dosierung zwei Infusionen, mit 600 mg Dosierung drei Infusionen nacheinander erhalten.

Im Folgenden sind zwei Beispiele der Rutheniumkinetiken als Spaghetti-Plots dargestellt.

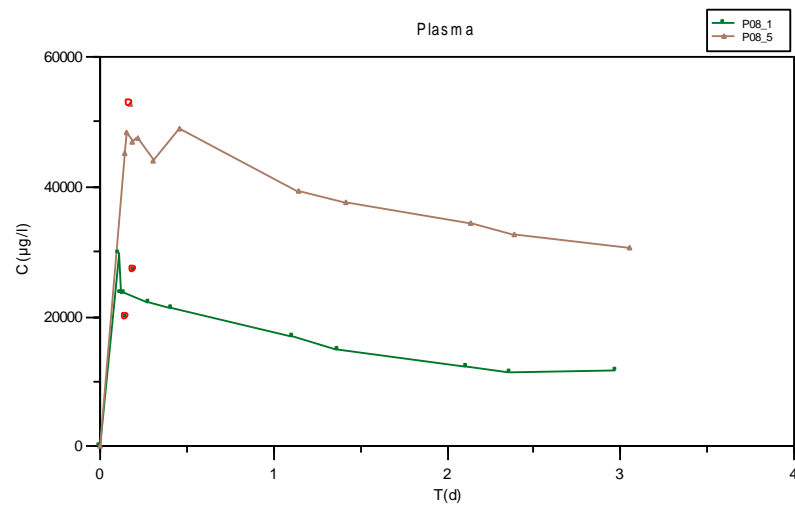


Abbildung 13 Patient 8 (600 mg): Spaghetti Plot, 1. und 5. Gabe

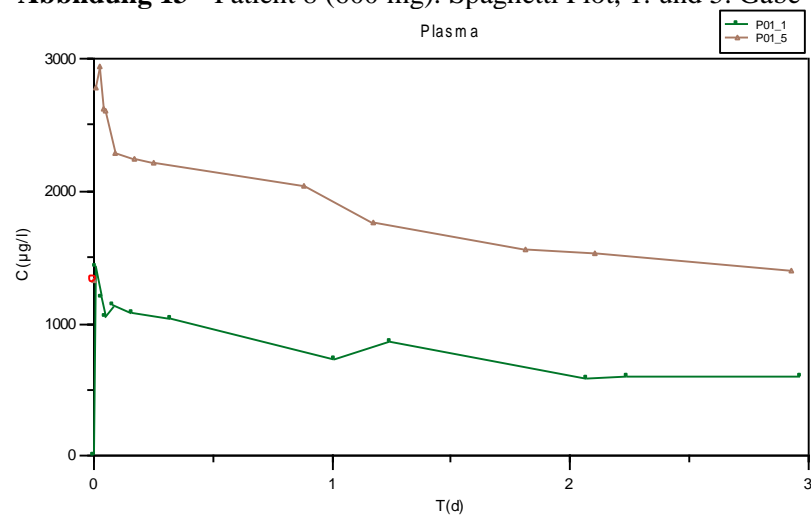


Abbildung 14 Patient 1 (25 mg): Spaghetti Plot, 1. und 5. Gabe

In den Spaghetti-Plots ist bei Patient P08 sowohl nach erster als auch nach fünfter Gabe ein zweites Maximum zu erkennen. Dieses Doppel-Peak-Phänomen ist erst ab einer Dosierung von 400mg FFC14A absolut erkennbar. Alle anderen Konzentrationen weisen dieses Phänomen nicht auf.

Ergebnisse

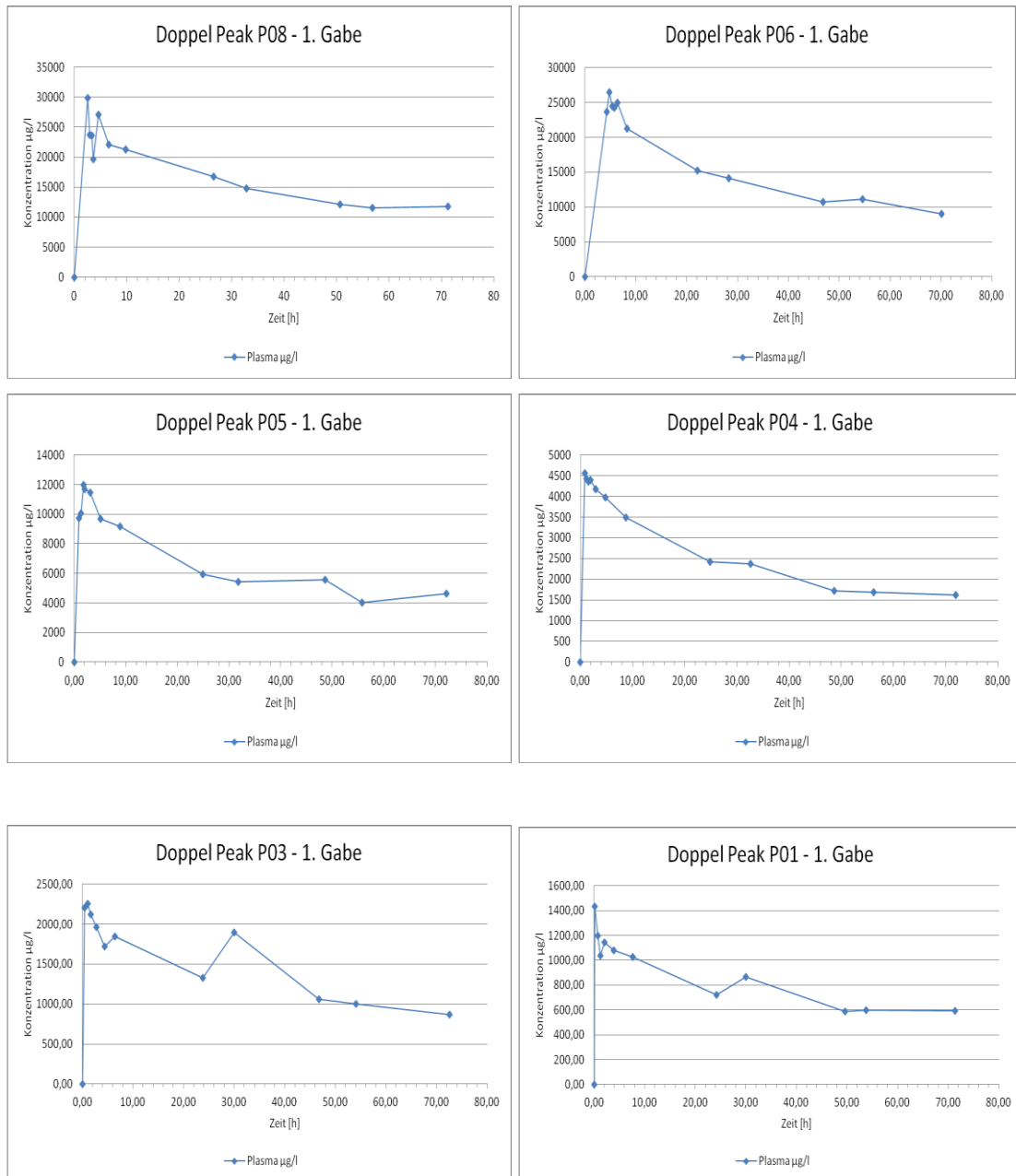


Abbildung 15 Doppelpeak Vergleich P01 bis P08

Für die pharmakokinetische Auswertung wurden alle Messwerte der gemessenen Plasmaproben je Rutheniumkonzentration mit dem Programm Kinetica 4.2 analysiert. Unter Angabe der entsprechenden Dosierung und Infusionsdauer wurden die Konzentrations-Zeit-Diagramme erstellt und pharmakokinetische Parameter errechnet. In den unten aufgeführten Tabellen sind die Ergebnisse für jeweils die erste und fünfte Infusion zusammengefasst. Nur nach diesen Infusionen

wurden über einen längeren Zeitraum die festgelegten Proben (siehe Kap.2.8.3) entnommen, so dass hiernach eine Aussage über das pharmakokinetische Modell getroffen werden konnte.

Tabelle 26 Pharmakokinetische Parameter in Plasma berechnet mit Kinetica 4.2, Zwei-Kompartiment-Modell

	1. Infusion					
Parameter	25 mg	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg	600 mg
$c_{\max \text{ calc}}$ [mg/L]	1,54	2,25	4,56	12,51	26,52	178,4 2
$t_{\max \text{ calc}}$ [h]	0,132	0,38	0,74	0,86	4,23	2,58
AUC [mg*h/L]	104,03	186,15	1,44E+12	1940,92	1878,61	2343,5
$t_{1/2\alpha}$ [h]	0,28	3,29	12,78	6,67	5,41	0,012
$t_{1/2\beta}$ [h]	67,21	77,65	6,48E+11	218,37	72,01	57,84
Cl [ml/min]	0,8	0,9	2,33E-10	0,34	0,71	0,85
V_{ss} [L]	4,67	5,95	13,04	6,31	4,44	3,56
	5. Infusion					
Parameter	25 mg	50 mg	100 mg	200 mg	400 mg	600 mg
$c_{\max \text{ calc}}$ [mg/L]	2,92	4,66	17,71	96,23	44,59	47,6
$t_{\max \text{ calc}}$ [h]	0,14	0,21	0,39	0,88	2,1	2,65
AUC [mg*h/L]	302,21	1278,27	1349,59	2593,94	9815,04	3,73E+04
$t_{1/2\alpha}$ [h]	0,98	3,79	0,76	0,37	12,93	49,37
$t_{1/2\beta}$ [h]	92,86	247,99	134,69	82,97	208,78	1139,84
Cl [ml/min]	0,27	0,13	0,24	0,25	0,13	0,05
V_{ss} [L]	2,21	2,8	2,86	1,79	2,4	5,06

Für die Patienten P08, P06 und P05 wurde zusätzlich eine Auswertung unter der Betrachtung aller 6 Infusionen erstellt, die ebenfalls in Tabelle 28 zu sehen ist.

Für die Halbwertszeit $t_{1/2\alpha}$ wurden Werte ermittelt, die zwischen 0,28 h und 50,22 h, für $t_{1/2\beta}$ zwischen 67,21 h und 1139,84 h lagen. Da es sich hier um unterschiedliche Konzentrationsbereiche handelt, konnte kein Mittelwert gebildet werden. Dennoch kann festgehalten werden, dass die Halbwertszeit der β -Phase bis zu 20-fach länger sein kann als die der α -Phase. Bei den Patienten P04 (100 mg) und P08 (600 mg) wurden trotz der Wichtung $1/Y_{\text{pred}}^2$ erhebliche Schwankungen der Messwerte festgestellt, die nicht geklärt werden konnten. Die Clearance wurde für alle Patienten separat bestimmt und lag zwischen 0,05 ml/min und 0,9 ml/min. Für das Verteilungsvolumen V_{ss} konnten Werte zwischen 1,74 L und 13,04 L berechnet werden. In der Gesamtbetrachtung der

Ergebnisse

Patienten P08, P06 und P05 bezogen auf alle 6 Infusionen lag das Verteilungsvolumen V_{ss} zwischen 1,74 L und 2,12 L.

Alle Messergebnisse haben die Vermutung bestätigt, dass Ruthenium eine lange Halbwertszeit bei einer geringen Clearance und kleinem Verteilungsvolumen aufweist.

Tabelle 27 Pharmakokinetische Parameter in Plasma berechnet mit Kinetica 4.2, Zwei-Kompartiment-Modell, 1. bis 6. Infusion kumulativ dargestellt

	6 Infusionen je Dosis		
Parameter	200 mg (P05)	400 mg (P06)	600 mg (P08)
$c_{\max \text{ calc}}$ [mg/L]	25,41	47,77	55,8
$t_{\max \text{ calc}}$ [h]	337,92	336,72	411,12
AUC_{tot} [mg*h/L]	11174,04	10711,44	21246,12
$t_{\frac{1}{2}\alpha}$ [h]	10,52	9,65	30,62
$t_{\frac{1}{2}\beta}$ [h]	188,34	128,8	656,49
Cl [ml/min]	0,06	0,125	0,094
V_{ss} [L]	1,75	1,74	2,12

Die Bindungsuntersuchungen von Ruthenium mit HSA und Transferrin wurden mit der HPLC Analytik durchgeführt und anschließend mit dem Programm Excel 2007 ausgewertet. Es konnte ermittelt werden, dass ca. 5 Mol Ruthenium an HSA und ca. 2 Mol an Transferrin binden. Der gesamte Bindungsprozess an HSA war wie im folgenden Diagramm graphisch dargestellt nach ca. 6 h abgeschlossen.

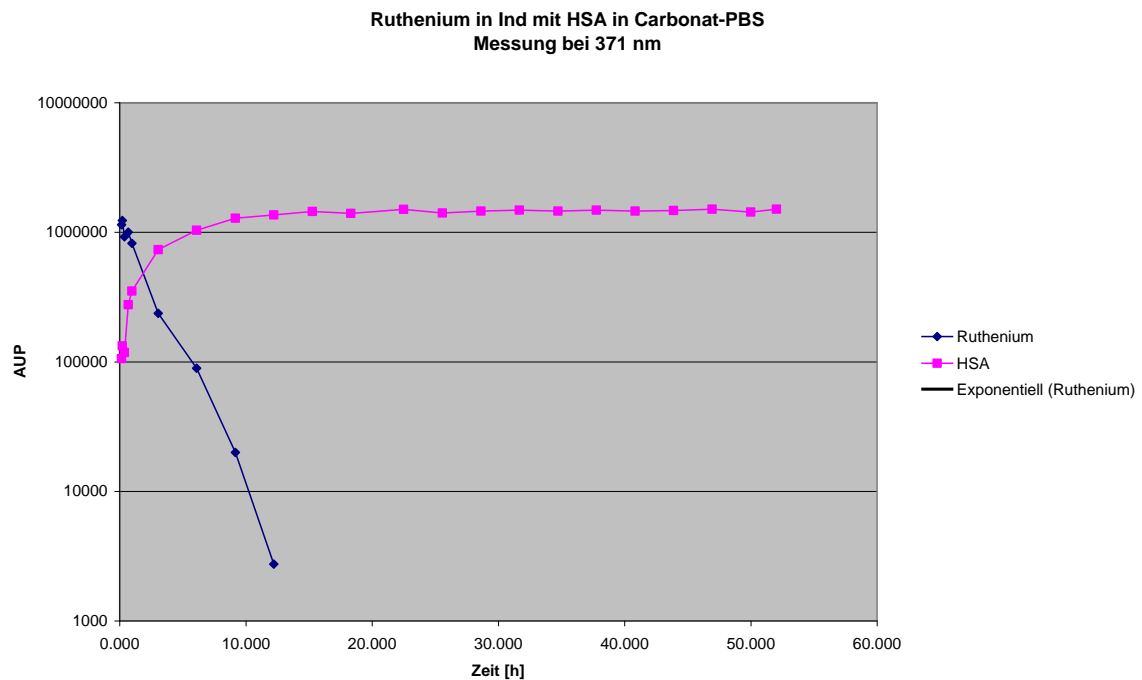


Abbildung 16 Bindungsreaktion und Stabilität von FFC14A mit HSA, halblogarithmische Darstellung

Die Bindung von FFC14A an Transferrin erfolgte deutlich schneller und war nach ca. 20 min abgeschlossen. Weitere Untersuchungen wurden nicht durchgeführt. Es sollte bestätigt werden, dass die beiden Proteine mit FFC14A reagieren und reversible Bindungen eingehen. Mit der vorliegenden HPLC Methode konnte jedoch der noch an HSA oder Transferrin gebundene Anteil von Ruthenium nicht gemessen werden, da das System für derartige Proteinmessungen nicht stabil genug gewesen war.

Die Metabolisierung von Ruthenium ist im Detail noch unbekannt und wurde in dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Die Urinproben wurden mit der ICP-MS Methode gemessen und mit dem Programm Excel 2007 ausgewertet. Der Urin sollte nach Möglichkeit fraktioniert gesammelt und pro Probe gemessen werden. Auf Grund von In-Compliance der Patienten wurden nicht alle Zeitpunkte eingehalten, so dass mit der Auswertung der Urinproben nur eine Tendenz der Urinkinetik dargestellt werden konnte.

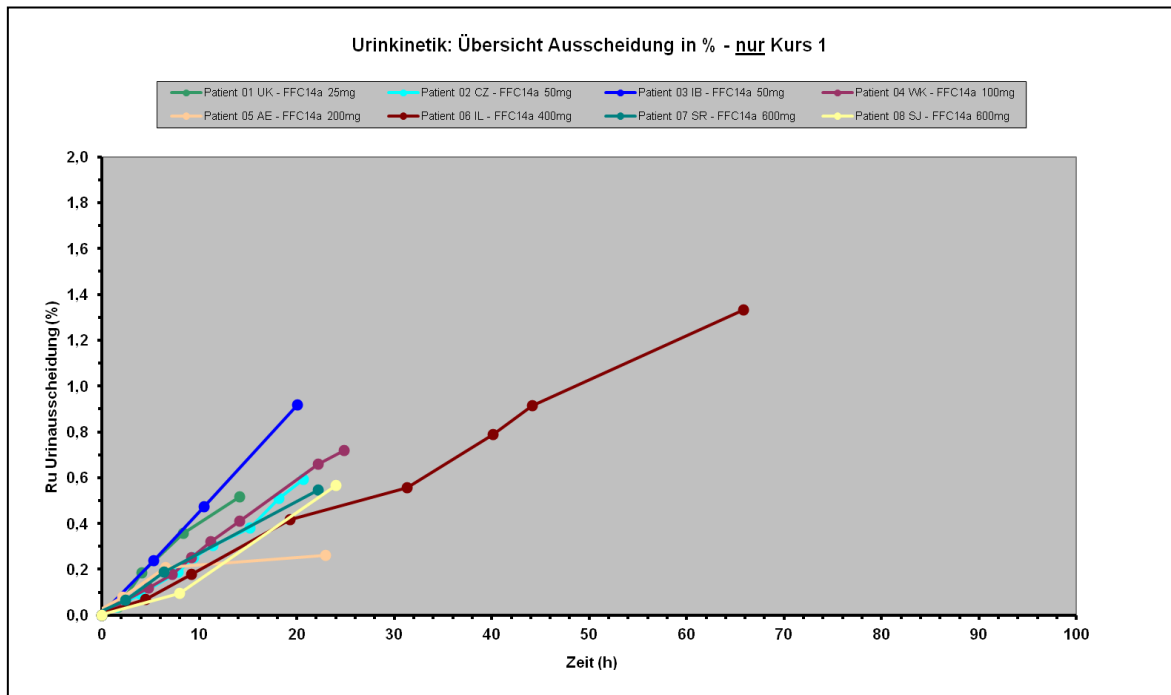


Abbildung 17 Graphische Darstellung der Urinkinetik nach 1. Gabe

In der o.a. Graphik ist eine kumulative Urinausscheidung dargestellt. Der vollständige Metabolismus von Ruthenium ist noch unbekannt. Weitere Untersuchungen zur Urinausscheidung wurden nicht gemacht.

3.4.2. Pharmakokinetische Parameter und Modellfitting von Indazol

Pharmakokinetische Analyse wurde analog der unter Kap.3.4.1 beschriebenen Rutheniumanalyse durchgeführt. Da es sich hierbei nur um eine ergänzende Betrachtungsweise der Indazolkinetik handelte, wurden die Daten lediglich stichprobenartig für wenige Patienten ausgewertet. Die Messdaten wurden in das Programm Kinetica 4.2 eingepflegt und die dazugehörigen pharmakokinetischen Parameter ermittelt. Als Wichtung wurde die Funktion $1/Y_{\text{obs}}^2$ gewählt, da hierbei die besten Werte der Bewertungskriterien (Akaike-Kriterium, Schwartz-Kriterium und objektive Funktion) für ein Zwei-Kompartiment-Modell erzielt wurden.

Tabelle 28 Kriterien des Modellfittings beispielhaft für Patient P08

	P08	
Zwei-Kompartiment-Modell	Wichtung: $1/Y_{\text{obs}}^2$	Wichtung: $1/Y_{\text{calc}}^2$
Objektive Funktion	2,53	24,33
Akaike-Kriterium	31,28	87,79
Schwartz-Kriterium	29,72	86,23

Der Wert für die Halbwertszeit $t_{1/2\alpha}$ betrug für den Patienten P08 1,12 h, $t_{1/2\beta}$ 47,84 h was darauf hindeutet, dass zunächst ein rascher Abfall der Plasmakonzentration von einem deutlich langsameren gefolgt wird. Die Gesamt-Clearance lag bei 160,01 ml/min und das Verteilungsvolumen V_{ss} bei 1811,13 L. Somit weist Indazol eine kurze Halbwertszeit in der α -Phase, eine deutlich längere Halbwertszeit in der β -Phase, eine hohe Gesamt-Clearance und großes Verteilungsvolumen auf. In der nachfolgenden Tabelle sind die pharmakokinetischen Parameter für zwei Patienten zusammengetragen.

Tabelle 29 Pharmakokinetische Parameter im Ultrafiltrat berechnet mit Kinetica 4.2, Zwei-Kompartiment-Modell, 1. bis 6. Infusion kumulativ dargestellt

	6 Infusionen je Dosis	
Parameter	P06	P08
c_{max} [mg/L]	1,11	0,4
t_{max} [h]	167,52	242,64
AUC_{tot} [mg*h/L]	54,49	44,29
$t_{1/2\alpha}$ [h]	1,12E-06	1,12
$t_{1/2\beta}$ [h]	10,08	47,84
Cl [ml/min]	86,72	160,01
V_{ss} [L]	957,48	1811,13

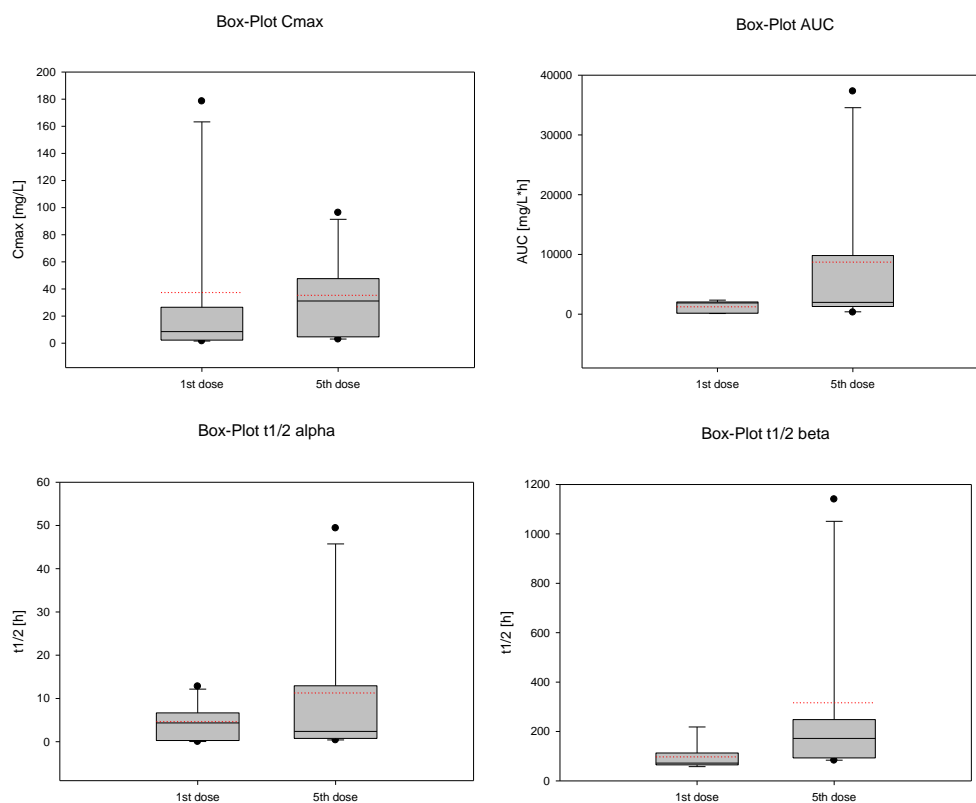
3.4.3. Patientenbezogene Ergebnisse

In die Studie wurden insgesamt 8 Patienten eingeschlossen. Zwei Patienten (P02 50 mg, P07 600 mg) mussten die Therapie vorzeitig aus gesundheitlichen Gründen ohne Zusammenhang mit

der Verabreichung von FFC14A abrechnen. Für diese wurden ersatzweise für die jeweilige Dosierung zwei neue Patienten aufgenommen. Der erste Patient (P01), der eine Dosis von 25 mg Ruthenium absolut erhielt, durchlief zwei Kurse der Therapie, da keine Progredienz der Erkrankung und gute Verträglichkeit vorherrschten. Insgesamt haben alle Patienten die Therapien gut vertragen und wiesen keine therapieassoziierten Toxizitäten auf. Der limitierende Faktor in der Dosisfindung war die Infusionsmenge. Je höher die Dosierung, desto größer wurde das Infusionsvolumen. Aus diesem Grund war die höchste zu verabreichende Dosis auf 600 mg FFC14A festgesetzt worden.

3.5. Statistische Datenanalyse

Die statistische Auswertung der ermittelten Daten wurde mit der Software Sigmastad 3.0 durchgeführt. Eine entsprechende grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Software Sigmaplot 7.1.0.1. In den folgenden Box-Plot Diagrammen sind die Ergebnisse der pharmakokinetischen Parameter c_{\max} , AUC, $t_{1/2\alpha}$, $t_{1/2\beta}$, CI und V_{ss} jeweils für die erste und fünfte Dosierung eines Gruppenvergleichs dargestellt.



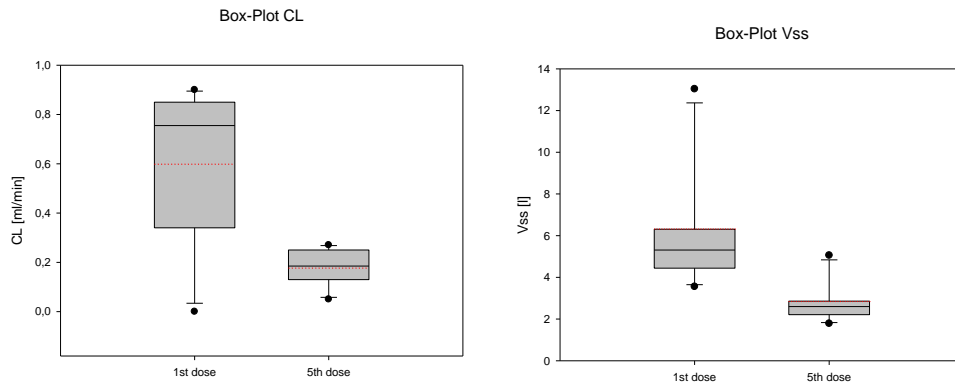


Abbildung 18 Box-Whisker-Plots, in einer 5/95% Perzentilldarstellung mit Median (durchgezogene Linie), Mittelwert (rote gestrichelte Linie) und Ausreißern (schwarze Punkte)

Für die statistische Evaluierung wurden die mit der Software Kinetica 4.2 ermittelten Werte der pharmakokinetischen Parameter übernommen und mittels des gepaarten t-Test und des Wilcoxon-Rang Tests analysiert. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 30 Gepaarte Gruppenanalyse

Parameter	Infusion	Median [n=6]	Gruppenvergleichstest	Irrtumswahrscheinlichkeit
c_{\max} [mg/L]	1. te Gabe	8,535	Wilcoxon Rang Test	P = 0,438
	5. te Gabe	31,150		
AUC_{tot} [mg*h/L]	1. te Gabe	1909,77	Wilcoxon Rang Test	P = 0,438
	5. te Gabe	1971,77		
$t_{1/2\alpha}$ [h]	1. te Gabe	4,740	Student's gepaart t-Test	P = 0,493
	5. te Gabe	11,367		
$t_{1/2\alpha}$ [h]	1. te Gabe	4,350	Wilcoxon Rang Test	P = 0,688
	5. te Gabe	2,385		
$t_{1/2\beta}$ [h]	1. te Gabe	74,830	Wilcoxon Rang Test	P = 0,688
	5. te Gabe	171,735		
Cl [ml/min]	1. te Gabe	0,600	Student's gepaart t-Test	P = 0,054
	5. te Gabe	0,178		
Cl [ml/min]	1. te Gabe	0,755	Wilcoxon Rang Test	P = 0,094
	5. te Gabe	0,185		
V_{ss} [L]	1. te Gabe	6,328	Student's gepaart t-Test	P = 0,078
	5. te Gabe	2,853		
V_{ss} [L]	1. te Gabe	5,310	Wilcoxon Rang Test	P = 0,063
	5. te Gabe	2,600		

Die pharmakokinetischen Parameter wurden auf ihre Normalverteilung untersucht und in Abhängigkeit der Ergebnisse ein Student's gepaart Test und/oder ein Wilcoxon Rang Test durchgeführt. Die Messergebnisse für $t_{1/2\alpha}$, Cl und V_{ss} folgten einer Normalverteilung, alle anderen Messergebnisse waren nicht normalverteilt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gaben konnte nicht festgestellt werden. Lediglich für die Clearance (Cl) und das Verteilungsvolumen (V_{ss}) wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ (5%) mit $p = 0,054$ für Cl (gepaarter t-Test) und $p = 0,078$ für V_{ss} (gepaarter t-Test) knapp verfehlt.

4. Diskussion

In der Vergangenheit wurden neue Rutheniumverbindungen synthetisiert und auf ihre Wirkung gegenüber Tumorzellen untersucht. Darunter befand sich der vielversprechende *trans*-Natrium-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat (III) Komplex (FFC14A).

4.1. Bioanalytik

Um das Verhalten von FFC14A im Organismus nachzuvollziehen, wurde eine Reihe bioanalytischer Methoden getestet, um die beste Messmethode zu ermitteln. Zunächst sollte die Frage geklärt werden, ob und wie FFC14A an Plasmaproteine bindet. Dieses wurde mit der HPLC-Methode und einem PDA-Detektor untersucht, wobei das Bindungsverhältnis von FFC14A an HSA und Transferrin ermittelt werden konnte. Diese Methode war jedoch nicht zuverlässig genug, um Patientenproben zu messen und die an HSA und Transferrin gebundenen Mengen des Komplexes, zu bestimmen. Die Proben mussten um ein Vielfaches verdünnt werden, damit sie die Säule nicht verklebten. Jede einzelne Messung dauerte bis zu 30 Minuten. Im Weiteren wurde die HPLC mit MS Gerät gekoppelt, um die Sensitivität zu erhöhen und nach vorangegangener chromatografischer Trennung den eluierten Komplex zu detektieren und zu quantifizieren. Auch diese Messmethode, die deutlich bessere Daten lieferte als die HPLC-Analytik, erwies sich als zu unzuverlässig. Daraufhin wurden alle Proben mit der in Kapitel 2.5 beschriebenen ICP-MS-Analytik gemessen. Es war mit dieser Methode zwar nicht möglich, die an die Proteine gebundenen Anteile von FFC14A zu messen, man konnte jedoch aus dem entnommenen Blut das Plasma mit den Proteinen entsprechend vorbereiten und sowohl den freien als auch den gebundenen Teil des Komplexes gemeinsam messen. Diese Messmethode hatte zusätzlich den Vorteil, bei Patienten, die mit Platinverbindungen vorbehandelt worden waren das Vorhandensein von Platinionen auszuschließen. Alle geforderten Validierungskriterien der SOP 12 "Validation of Bioanalytical Methods" (2003) konnten für alle Messungen eingehalten werden (vgl. Kap.3.2).

Zur Beurteilung der Selektivität wurde das System vor und in regelmäßigen Abständen zwischen den Probenmessungen gespült und Leerproben gegen definierte Standards gemessen. Die Messung der Leerprobe ergab für das Rutheniumion im Mittel einen Wert von 362,65 c/s und für die Standardprobe 1,0 µg/L einen Wert von 377666,70 c/s. Ausgehend von dem Mittelwert, waren die Berechnungen präzise mit einer relativen Standardabweichung von maximal 4,90% im Plasma und 4,83% im Ultrafiltrat für den LLOQ Wert. Dieser Wert lag deutlich unter den geforderten 20% für die unterste Nachweisgrenze. Alle anderen Werte, für die laut SOP 12 (2003) 15% vorgeschrieben

waren, lagen sowohl für Plasma als auch Ultrafiltrat unter 2,5%. Ebenso wurden alle geforderten Grenzwerte für die Richtigkeitsbestimmung mit max. 3,35% im Plasma und -6,3% im Ultrafiltrat für die relative Standardabweichung eingehalten (vgl. Kap.3.2.1.6). Für die Linearitätsbestimmung wurde ein Messbereich im Plasma von 0,001 - 10,0 µg/L und im Ultrafiltrat von 0,001 - 1,0 µg/L festgelegt. Die Abweichung betrug für Ultrafiltrat max. -4,19% und für Plasma max. +3,92%. Alle gemessenen Werte lagen in den Messbereichen. Die Plasmaproben wurden mit einem Faktor 10000 verdünnt, so dass auch hier die höchsten Messwerte innerhalb des vorgegebenen Messbereiches lagen. Bei der Analyse der Patientenproben wurde im Ultrafiltrat bei Patient P08 ein c_{\max} von 30,36 µg/L Ruthenium gemessen, entsprechend einer c_{\max} von 179,72 µg/L FFC14A, bei einer Ausgangsdosierung von 600 mg FFC14A absolut in der Infusionslösung von 1,587 Litern. In der folgenden Übersicht sind für jede Dosierung die gemessenen c_{\max} für Ruthenium bzw. FFC14A im Plasma und Ultrafiltrat zusammengestellt.

Tabelle 31 Gegenüberstellung der gemessenen Rutheniumkonzentrationen im Plasma

Ruthenium Konzentrationen in Plasma			
Patient	Dosis pro Infusion absolut [mg]	Plasma Ru-Ion [µg/L]	Berechnete Konzentration FFC14A [µg/L]
P08	600	55805,26	330353,67
P06	400	47759,28	282723,41
P05	200	25412,02	150433,02
P04	100	9692,69	57378,38
P03	50	5177,87	30651,74
P01	25	5982,79	35416,67

Tabelle 32 Gegenüberstellung der gemessenen Rutheniumkonzentrationen im Ultrafiltrat

Ruthenium Konzentrationen in Ultrafiltrat			
Patient	Dosis pro Infusion absolut [mg]	UF Ru-Ion [µg/l]	Berechnete Konzentration FFC14A [µg/L]
P08	600	30,36	179,72
P06	400	92,97	550,35
P05	200	58,34	345,35
P04	100	9,56	56,59
P03	50	78,12	462,45
P01	25	35,40	209,55

Während die jeweils höchsten gemessenen Werte im Plasma bei den Patienten P08, P04, P03 und P01 nach der 6. Gabe nach Erreichen der kalkulierten c_{\max} auftraten, wurden die entsprechenden höchsten Messwerte bei P06 und P05 bereits nach der 5. Gabe, nach Erreichen der c_{\max} gemessen. Diese Schwankungen könnten auf individuelle Stoffwechselvorgänge bei den Patienten zurückzuführen sein.

Bei Vergleich deren pharmakokinetischer Parameter (vgl. Kap. 3.2.1) stellt man fest, dass bei P06 und P05 V_{ss} kleiner als bei den anderen Patienten und die Halbwertszeit etwas kürzer war. Diese beiden Faktoren könnten zu einem schnelleren Abfall des Plasmaspiegels führen, was wiederum bedeuten würde, dass die 6. Gabe eher hätte stattfinden müssen, um einen höheren Plasmaspiegel aufrecht zu erhalten. Die gemessenen c_{\max} von FFC14A im Plasma (Tabelle 31) lässt einen stetigen Anstieg des Wirkstoffs erkennen. Eine lineare Abhängigkeit von der applizierten absoluten Dosis und der im Anschluss nach der 6. Gabe gemessenen c_{\max} ist in der nachfolgenden Grafik dargestellt und wird durch den Determinationskoeffizienten $R^2=0,9636$ beschrieben. Dieser erreicht durch die Streuung der Messwerte nicht die gewünschte Güte von mehr als $R^2=0,998$. Höhere Determinationskoeffizienten werden für polynomische Anpassungen 2. oder sogar 3. Ordnung erreicht. Werden alle Messpunkte desselben Diagrammes miteinander verbunden, so könnte man vermuten, dass mit steigender Konzentration eine Sättigung zu erreichen ist und der zunächst lineare Verlauf in eine Sättigungskurve übergeht. Alternativ besteht die Möglichkeit, dass mit höherer Konzentration eine höhere Absättigung der Proteine und Tumorzellen mit FFC14A erfolgt, wodurch eine bessere lineare Korrelation resultiert. Stellt man alle Werte gegenüber, so lässt sich ein in etwa ein Verhältnis von 1:2, bis auf Patient P01, erkennen.

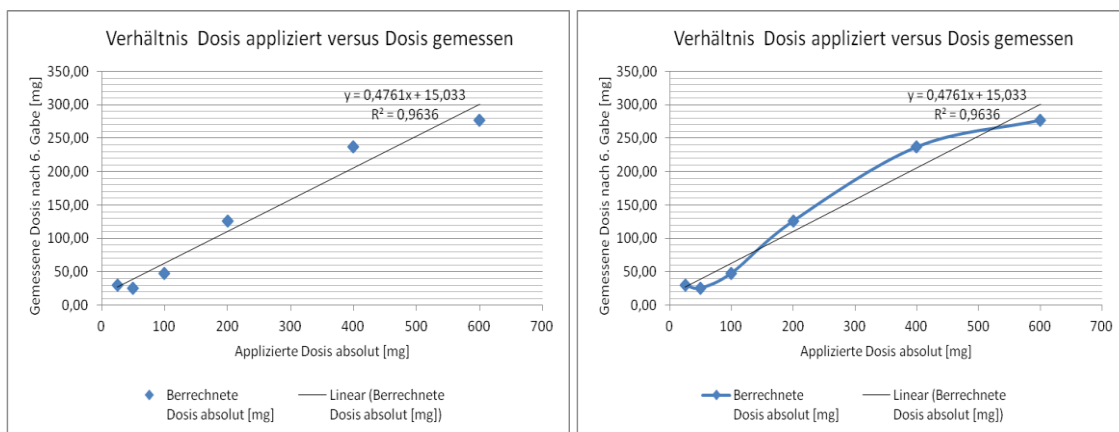


Abbildung 19 Zusammenhang zwischen applizierter und gemessener Dosis im Plasma

Die variablen Plasmaspiegel deuten darauf hin, dass noch kein Steady-State-Zustand erreicht wurde und eine Anpassung des Dosierungs-Protokolls erfolgen sollte.

Im Gegensatz zu den Plasmawerten zeigen die Ultrafiltratmesswerte keine lineare Korrelation. Sie sind in Abbildung 20 dargestellt. In der rechten Grafik wurden die Messpunkte miteinander verbunden, um den Verlauf der Kurve hervorzuheben.

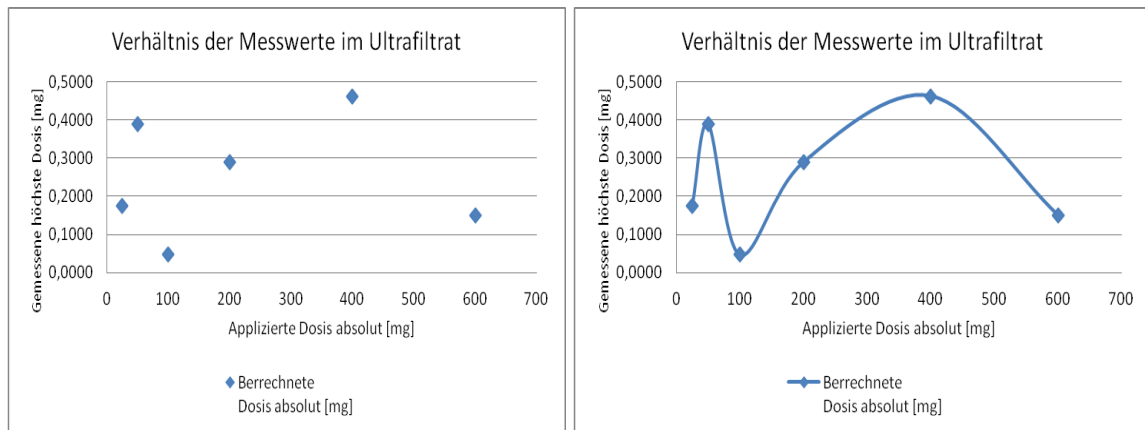


Abbildung 20 Zusammenhang zwischen applizierter und gemessener Dosis im Ultrafiltrat

Bei den Patienten P01 und P03 wurden die höchsten Werte nach der ersten, bei P04 und P05 nach der fünften und bei P06 und P08 nach der sechsten Infusion erreicht (Tabelle 33). Folglich ist der freie, in der Blutbahn vorliegende Anteil von FFC14A bis zu einer absoluten Dosis von 600 mg sehr gering und führt bei den Patienten zu keinen toxischen Nebenwirkungen.

4.2. Pharmakokinetik Ruthenium - ICP-MS

Um den zeitlichen Verlauf der Konzentration von FC14A in Patienten zu untersuchen, wurden die wichtigsten pharmakokinetischen Parameter mit der Software Kinetica 4.2 ausgewertet. Mit Hilfe der Modellfitinganalyse wurden verschiedene Kompartimentsysteme miteinander verglichen und das Zweikompartiment-Modell für die Beschreibung des pharmakokinetischen Verhaltens von FFC14A gewählt. Im Folgenden sollen die einzelnen Parameter und deren Resultate diskutiert werden.

4.2.1. Maximale Konzentration c_{\max}

c_{\max} wurde separat für die 1. und die 5. Gabe für jede Dosis ermittelt und erreichte ihr Maximum bei Infusionsende (Tabelle 30). Sie lag zwischen 1,54 mg/L (25 mg Dosis) und 178,42 mg/L

(600 mg Dosis) und entsprach den in der Universität Bonn mit der flammenlosen AAS gemessenen Werten. Eine statistische Auswertung beider Gaben ($p=0,438$ Wilcoxon Rang Test) ergab keinen signifikanten Unterschied. Ab einer Dosis von 400 mg wurde ein zweites Maximum gemessen, das bei Patient P08 (600 mg) 4,62 h nach der 1. Gabe, 10,80 h nach der 5. Gabe und bei P06 (400 mg) 6,38 h nach der 1. Gabe, 4,25 h nach der 5. Gabe auftrat. Ein derartiges Doppel-Peak-Phänomen ist nach einer Infusion in der Literatur nicht bekannt. Für den Wirkstoff Talinolol, der oral verabreicht wurde, sind Doppel-Peaks in der Literatur beschrieben worden. (Weitschies et al., 2005)

Da die Infusionslösungen ab einer Dosierung von 400 mg mit jeweils 200 mg FFC14A hergestellt und nacheinander verabreicht wurden, ist eine plausible Erklärung für den zweiten Peak eine Verzögerung bei dem Anhängen der Folgeinfusion. Aus den Protokollen konnte jedoch keine signifikante Verzögerung zwischen den Infusionsgaben festgestellt werden. Bei P06 (400 mg, 5. Gabe) wurde der zweite Infusionsbeutel vier Minuten nach dem ersten angehängen und die gesamte Infusion war nach 2,1 h abgeschlossen. Das zweite Maximum wurde aber nach 4,25 h gemessen.

Eine andere mögliche Erklärung ist, dass der erste Peak von der Lipidlöslichkeit des Wirkstoffs und seiner Wechselwirkung mit dem P-Glykoprotein zusammenhängt und der zweite Peak über eine Absorption mit Beteiligung der Lymphwege zustande kommt. Der zweite Peak kann auch durch Bindungsvorgänge an HSA, das unter anderem in tiefer gelegene Kompartimente abwandert und FFC14A erst verzögert aus der Bindung freisetzt, begründet sein. Auch kann der Leberstoffwechsel die Freisetzung von FFC14A ins Blut bewirken oder die Filtration in der Niere zur Dissoziation von FFC14A und HSA führen, so dass es nach Rückresorption zu einem zweiten Peak kommt.

Eine weitere Bestimmung von c_{\max} wurde im Hinblick auf die Bindungsaktivität von Ruthenium an Plasmaproteine (Patient P08) durchgeführt. Hierbei wurde festgestellt, dass Ruthenium nicht an apo-Transferrin bindet. Dieses Ergebnis würde der Theorie, dass Ruthenium an Transferrin bindet und anschließend in die Zellen eingeschleuft wird, widersprechen. Diese Frage lässt sich nur durch weitere Untersuchungen mit Fraktionierung der Proteine beantworten.

4.2.2. Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve AUC

Die statistische Auswertung der AUC_{tot} im Plasma mittels Wilcoxon Rang Tests ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen der ersten und fünften Gabe ($p=0,438$). Ein Vergleich der Gesamt AUC_{tot} für P05 (200 mg) 11.174,04 mg*h/L, P06 (400 mg) 10.711,44 mg*h/L und P08 (600 mg) 21.246,12 mg*h/L lässt auf kein eindeutiges Verhalten von FFC14A schließen. Bei

Vorliegen einer linearen Kinetik müsste die AUC mit der verabreichten Dosis korrelieren. Dieses ist weder bei P05 noch bei P06 der Fall. Die AUC bei einer Dosis von 400 mg ist sogar geringfügig kleiner als bei 200 mg. Die Dosiserhöhung von 400 mg auf 600 mg führt wiederum zu einer Verdoppelung der AUC. Betrachtet man die AUC nur nach der 5. Gabe, so finden sich dort deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Messwerten. Von 25 mg zu 50 mg vervierfacht sich die AUC (302,21 mg*h/L zu 1278,27 mg*h/L), von 50 mg zu 100 mg bleibt sie annähernd gleich (1278,27 mg*h/L zu 1349,59 mg*h/L), von 100 mg zu 200 mg verdoppelt sie sich (1349,59 mg*h/L zu 2593,94 mg*h/L), und von 200 mg zu 400 mg ist die AUC mehr als dreifach so hoch (2593,94 mg*h/L zu 9815,04 mg*h/L). Der Wert für 600 mg liegt bei $3,73E^{+04}$ mg*h/L und lässt keinen aussagekräftigen Vergleich zu 400 mg zu. Die Schwankungen der AUC können darauf hindeuten, dass eine Sättigungskonzentration noch nicht erreicht wurde und diverse Austauschvorgänge zwischen verschiedenen Kompartimenten stattfinden.

4.2.3. Halbwertszeit $t_{1/2}$

Der ermittelte Plasmaspiegelverlauf lässt passend zu dem Zwei-Kompartiment-Modell eine initiale steilere Abnahme der Konzentration ($t_{1/2\alpha}=10,52h$; 200mg alle Gaben) und eine deutlich langsamere terminale Abnahme der Konzentration ($t_{1/2\beta}=188,34h$) erkennen. Die Dauer der terminalen Eliminationsphase scheint den größten Einfluss auf die berechnete AUC zu haben (vgl. Tabelle 27). Ein signifikanter Unterschied zwischen der 1. und 5. Gabe wurde weder in der Verteilungsphase noch in der Eliminationsphase festgestellt. Die terminalen Halbwertszeiten in den jeweiligen Dosierungsstufen unterliegen großen Schwankungen und könnten auf noch nicht abgeschlossene Verteilungsprozesse zurückzuführen sein. Es ist nicht davon auszugehen, dass sich die Elimination verändert hat.

4.2.4. Clearance Cl

In dem Student's gepaarten t-Test wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der ersten und fünften Gabe ($p=0,054$) von FFC14A für die Clearance Cl festgestellt. Die errechnete Cl (vgl. Tabelle 31) nach der ersten Infusion lag zwischen 0,34 ml/min und 0,9 ml/min. Nach der fünften Gabe waren die Werte deutlich niedriger und lagen zwischen 0,05 ml/min und 0,27 ml/min. Obwohl die AUC passend zur Abnahme der Cl zunahm, ließ sich kein reziprok proportionales Verhalten zwischen beiden Parametern erkennen. In der Auswertung der Cl für P05, P06 und P08 nach Verabreichung aller sechs Infusionen wurden Werte von 0,06 ml/min, 0,125 ml/min und

0,094 ml/min errechnet. Im Allgemeinen scheint sich eine Gesamtausscheidung von 0,1 ml/min einzustellen. Es ist unbekannt, in welchem Umfang FFC14A bei der Leberpassage extrahiert wird. Durch seine Bindung an HSA, dessen Konzentration durch die Leberaktivität bestimmt wird, ist die Vermutung naheliegend, dass FFC14A stärker von dem Leberstoffwechsel betroffen ist.

4.2.5. Verteilungsvolumen V_{ss}

Die statistische Analyse des Verteilungsvolumens V_{ss} in dem Gruppenvergleichstest Student's gepaart t-Test zeigte mit $p=0,078$ keinen signifikanten Unterschied für die erste und fünfte Gabe von FFC14A. Die Verteilungsvolumina liegen nach der ersten Infusion zwischen 4,44 L und 13,04 L und nach der fünften Infusion zwischen 1,79 L und 5,06 L. Die Auswertung der Daten für die 200 mg, 400 mg und 600 mg Dosierungen ergibt nach Gabe aller Infusionslösungen Volumina von 1,75 L, 1,74 L und 2,12 L. Folglich pendelt sich das V_{ss} auf ca. 2 L ein. Das Verteilungsvolumen ist klein und deutet auf ausgeprägte Wechselwirkung von FFC14A mit Blutbestandteilen hin. Am bekanntesten ist die Bindung an HSA und Transferrin. Es scheint auch eine Bindung an Erythrozyten stattzufinden, da bei DNA-Extraktionsversuchen ebenfalls ein geringer Anteil von Ruthenium gefunden wurde.

4.3. Pharmakokinetik Indazol - HPLC

Die Indazolpharmakokinetik wurde aus zwei Gründen untersucht. Zum Einen wurde es in einem Überschuss im Vergleich zu FFC14A verabreicht, da es stabilisierende Wirkung auf den Komplex und die Lösung hatte und zum anderen sollte geklärt werden, ob Indazol in der verabreichten Menge eine Auswirkung auf den Organismus hat und womöglich zu toxischen Nebenwirkungen führen könnte. Die pharmakokinetische Auswertung ergab, dass Indazol eine kurze Halbwertszeit $t_{1/2\alpha}$ (ca. 1,12h), eine deutlich längere Halbwertszeit $t_{1/2\beta}$ (ca. 10h-47h), eine hohe Gesamtclearance bis zu 160 ml/min und ein hohes Verteilungsvolumen bis zu 1811 L aufwies. Das beste passende Modell ist das Zweikompartiment-Modell, da hier die beste Fittinganalyse erzielt werden konnte. Während der gesamten Studie wurden keine toxischen Nebenwirkungen gemeldet, so dass Indazolhydrochlorid in den Konzentrationen, in denen es zusammen mit FFC14A verabreicht wurde, keine messbaren klinischen Auswirkungen hatte.

4.4. DNA-Addukte

Die Messung des Rutheniumions nach DNA-Extraktion sollte bestätigen, dass, wie bereits in der Literatur erwähnt (Egger, Arion et al., 2005, Hartmann 1995, Keppler, Hartmann 1994, Pieper, Keppler 1998), FFC14A nach intravenöser Applikation an DNA gebunden werden kann. Durch Messung der DNA-Addukte wurde eine Bindung bestätigt, allerdings nur in sehr geringen Konzentrationen. Ob dieser Mechanismus für die antitumorale Wirkung von FFC14A verantwortlich ist, muß in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

4.5. Galenik

FFC14A ist in wässrigen Lösungen stabil genug, um als Infusion appliziert zu werden (vgl. Kap. 1.2.2). Zwar zeigt das Natriumsalz die bessere Löslichkeit, die Indazolverbindung ist jedoch stabiler und führt nur zu 1% Abnahme der Konzentration pro Stunde. In Lösungen mit niedrigerem pH-Wert verlangsamt sich die Hydrolyse unter Bildung von Aquakomplexen. (Kratz, Hartmann et al., 1994, Seddon 1996, Smith et al., 1996) Die maximale Konzentration pro applikationsfertiger Infusionslösung wurde aus galenischen Gründen auf 200mg FFC14A absolut beschränkt. Bei zu hoher Konzentration kam es zu Präzipitatbildung im Infusionsbesteck und Infusionsbeutel, was auf eine deutliche Übersättigung der Lösung und das Erreichen des maximalen Volumens hindeutete. Aus diesem Grund wurden die Zubereitungen nur mit einem Infusionsbesteck mit einem in-line-Filter mit 0,22µm Porendurchmesser appliziert. Die Infusionsdauer betrug dann ca. 50 min für eine 200 mg Dosierung. Die Dosierungen von 400 mg und 600 mg FFC14A absolut wurden auf mehrere Zubereitungen von je 200 mg pro Beutel aufgeteilt und nacheinander appliziert. Das Gesamtvolumen für eine 600 mg-Zubereitung betrug 1578 ml. Auf eine weitere Dosissteigerung wurde verzichtet, da die zu applizierenden Volumina mehr als 2000 ml betragen hätten, die den Patienten im klinischen Alltag nicht hätten verabreicht werden können. Bis zu der Konzentration von 600 mg wurde FFC14A gut vertragen und führte zu keinen toxischen Nebenwirkungen. Da keine weitere Dosissteigerung möglich war, konnte die MTD nicht ermittelt werden. Es sollte daher im Weiteren überlegt werden, ob eine andere galenische Zubereitung, z.B. in Form von liposomalen Verabreichungsformen oder eine orale Formulierung die Applikation höherer Dosen ermöglicht. Hierzu müssten weitere präklinische Untersuchungen auch hinsichtlich der Absorption aus dem Gastrointestinaltrakt durchgeführt werden, um eine Aussage über Bioverfügbarkeit treffen zu können.

4.6. Wirkungsmechanismus

FFC14A wurde in zahlreichen *In-vitro*- und *In-vivo*-Untersuchungen auf seine antitumorale Wirkung und toxische Nebenwirkungen in unterschiedlichen Zelllinien und Tiermodellen im Vergleich zu Cisplatin, Doxorubicin, 5-FU, Vinblastin und Etoposid getestet. Zellen, die gegen diese Substanzen resistent waren, wiesen eine deutliche Sensitivität gegenüber FFC14A auf. In Mäuseversuchen lag die LD₅₀ bei 50mg/kg und konnte durch Volumenerhöhung auf 100mg/kg gesteigert werden. Nach einer fünftägigen Gabe von 50mg/kg/die wurde keine Mortalität festgestellt. In einer weiteren Langzeituntersuchung über acht Wochen an Spargue-Dawley Ratten mit einer Dosierung von 13mg/kg FFC14A wurden ebenfalls keine toxischen Nebenwirkungen registriert. In einer weiteren Langzeituntersuchung konnte ermittelt werden, dass nach einer Applikation von 50% der LD₅₀ eine geringe Nephrotoxizität auftrat, die sich in verminderter Ausscheidung von Wasser und osmotisch wirksamer Substanzen zeigte. Nach *In-vitro*-Untersuchungen an humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen wurde nach einer Langzeitexposition ein mit Doxorubicin vergleichbarer toxischer Effekt von FFC14A gefunden. Jedoch konnten die hämatologischen Effekte *in vivo* nicht bestätigt werden (vgl. Kap.1.2.6). Laut Depenbrock und Mitarbeitern (1997) könnte der Grund für die gute Verträglichkeit die spezifische Anreicherung von FFC14A in den Tumorzellen sein. Aus der Literatur ist bekannt, dass bis zu 90% von FFC14A an HSA (Humanserumalbumin) und ein geringerer Anteil an das Eisentransportprotein Transferrin bindet (vgl. Kap. 1.2.3). (Hartmann, 1995, Kratz, Hartmann et al., 1994, Kratz, Messori et al., 1993, Kratz, Mullinacci et al., 1992) Eigene Untersuchungen haben bestätigt, dass ca. 5 Mol FFC14A an HSA und 2 Mol an Transferrin gebunden werden. HSA gilt als das bekannteste Transportprotein im Körper und fängt den größten Teil von FFC14A ab. Tumorzellen haben einen erhöhten Bedarf an Eisen und exprimieren deshalb vermehrt Transferrinrezeptoren. Wenn also Transferrin FFC14A bindet, kann es dieses in die Tumorzellen transportieren. (Clarke, 1993, Hunnius, 1998, Pongratz et al., 2004) In Anbetracht des Bindungsverhältnisses an die beiden Proteine ist das ein sehr geringer Anteil, der auf diesem Weg in die Tumorzelle gelangt. Die geringe Toxizität lässt sich nicht nur durch die Akkumulation in der Zelle erklären. Der an HSA gebundene Anteil von FFC14A wird abgefangen und verbleibt so in der Zirkulation in der Blutbahn und wird anschließend mit den Proteinen weiter abtransportiert. Er steht den Tumorzellen zunächst nicht zur Verfügung. Hinzu kommen noch die Leber- und Nierenpassage. Es gibt Arzneistoffe, wie z.B. Verapamil, die zu 90% an Plasmaproteine gebunden und nach der Leberpassage bis zu 80% aus dem Blut entfernt werden. (Forth et al., 1998) Sollte FFC14A in der Leber ebenfalls zu so einem hohen Prozentsatz metabolisiert werden, würde das

auch die geringe Toxizität erklären. Erst wenn die enzymatische Inaktivierung in der Leber ihr Maximum erreicht hat oder eine Lebererkrankung vorliegt, würde die Bioverfügbarkeit von FFC14A steigen und die Toxizität zunehmen.

4.7. Schlussbemerkungen

Der *trans*-Natrium-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat (III) Komplex (FFC14A) ist auf Grund seiner guten antitumoralen Aktivität, die in einer Vielzahl von *In-vitro*-Untersuchungen belegt wurde, eine vielversprechende neue Rutheniumverbindung.

Durch ihre Bindung an das Eisentransportprotein Transferrin kann FFC14A direkt in die Tumorzellen eingeschleust werden. Genau auf diesem spezifischen Transport kann eine Tumorselektion beruhen, die Apoptose zur Folge hat. Dabei spielt der Eisensättigungsgrad des Transferrins eine entscheidende Rolle. Das zweifach eisenbeladene Transferrin hat die höchste Affinität an die Transferrinrezeptoren auf den Tumorzellen (vgl. Kap 1.2.3.) und kann eingeschleust werden. Folglich sollte für eine Rutheniumtherapie der Eisenstatus der Patienten geprüft werden, um die gewünschte Sättigung mit Eisen zu erreichen. FFC14A bindet jedoch nur zu einem geringeren Anteil an Transferrin. So scheint dieser Mechanismus zwar spezifisch zu sein, reicht aber nicht zur Erzielung des gewünschten Effekts aus. Transferrin wird nicht nur zu den Tumorzellen, sondern auch zu vielen anderen Zellen und Geweben im Körper abtransportiert. Damit kommt bei den Tumorzellen ein geringer Teil, der FFC14A einschleusen soll, an. FFC14A müsste also hochwirksam sein, damit die geringe Menge einen messbaren Effekt hervorruft.

Der Hauptanteil von FFC14A wird an HSA gebunden. Dieses Protein ist das Hauptprotein im Blutserum und bindet bis zu 90% von FFC14A. Stehle und Mitarbeiter (26(2),1997) halten Albumin für ein für das Tumorwachstum essentielles Protein und haben in Tiermodellen demonstriert, dass der Tumor der Hauptort für den Albuminkatabolismus zu sein scheint. Da Tumoren, bedingt durch ihr schnelles Wachstum, eine gesteigerte metabolische Aktivität aufweisen, nutzen sie Albumin als Lieferanten für Stickstoff und Energie. Tumorzellen nehmen Albumin endozytotisch auf und lösen es lysosomal in ihre Bestandteile auf. Auf diese Weise profitieren sie von den Zerfallsprodukten und nutzen diese für ihr Wachstum. (Stehle, Sinn, Wunder, Schrenk, Stewart et al., 1997) Folglich ist die Annahme, dass FFC14A nicht nur über Transferrin sondern auch über Albumin in die Tumorzellen aufgenommen wird, naheliegend.

Eigene Vorversuche haben gezeigt, dass 1 Mol HSA 5 Mol FFC14A binden kann. Stehle und Mitarbeiter haben in einer Arbeit über Methotrexat-Albumin-Konjugate gefunden, dass eine geringe Beladung des Proteins mit MTX zu besseren Bedingungen für die Aufnahme des MTX-

Protein-Konjugates in die Tumorzelle führt, als eine hohe Beladung. So wurden die besten Ergebnisse mit 1 Mol MTX pro Mol HSA erzielt. Konjugate, bei denen 5-20 Mol MTX pro Mol HSA gebunden waren, wurden von der Leber akkumuliert und vorzeitig aus der Zirkulation entfernt. (Stehle, Sinn, Wunder, Schrenk et al., 1997) Mit Abraxane[®], einer Albumin-Paclitaxel-Nanopartikel-Verbindung, wurde die Eigenschaft von Albumin als zielgerichtetes Transportmolekül ausgenutzt. Es wird hier als Lösungsvermittler benutzt und soll zu besserer Aufnahme von Paclitaxel in die Zellen führen. (www.abraxane.com, Prescribing Information) Ein ähnlicher Mechanismus wäre auch für FFC14A denkbar. In der vorliegenden Studie wurde die Bindung von FFC14A an HSA nicht untersucht. Sollte also die Annahme stimmen, dass mehrfach beladene HSA-Konjugate von der Leber vorzeitig eliminiert werden, so würde auch in diesem Fall nicht genug Wirkstoff in die Tumorzellen gelangen, da 1 Mol HSA 5 Mol FFC14A bindet.

Wie wird jedoch ein Albuminkonjugat zellulär aufgenommen? Maeda und Mitarbeiter (2000) beschreiben in ihrer Übersichtsarbeit den Enhanced Permeability and Retention Effekt (EPR), der für die Aufnahme von Lipiden und Makromolekülen in Tumorzellen verantwortlich sein soll. Dieser Effekt scheint generell in soliden Tumoren vorzukommen und basiert auf ausgedehnter Angiogenese und daher einer Hypervaskularisierung, einem fehlerhaften vaskulären Aufbau mit deutlich größeren Öffnungen in den Endothelzellen und einem unzureichend ausgeprägtem Lymphdrainagesystem. Bedingt durch diese Faktoren können Liposomen, Nanopartikel und Makromoleküle leichter in das Tumorgewebe diffundieren als in normales Gewebe. Ein Abtransport ist durch die mangelhafte Lymphdrainage deutlich erschwert, so dass man hier von gezieltem "drug targeting" spricht. Die Verweildauer der Makromoleküle in den Tumorzellen kann dabei mehr als 100 Stunden betragen. (Maeda et al., 2000, Matsumura, Maeda, 1986)

Die Bestimmung von FFC14A in Serum und Ultrafiltrat erwies sich als sehr schwierig. Eine genügend valide Methode, mit der man den an HSA und an Transferrin gebundenen Anteil von FFC14A hätte messen können, konnte nicht etabliert werden (vgl. Kap. 4.1) Stattdessen konnte eine sehr schnelle und effektive Analytik des Ruthenium-Ions entwickelt werden, die sowohl sehr sensitiv war als auch valide Ergebnisse lieferte. Mit ihr konnte die Gesamtkonzentration von Ruthenium im Serum gemessen werden und ein entsprechendes pharmakokinetisches Modell, ein Zwei-Kompartiment-Modell, etabliert werden. Im Ergebnis hat FFC14A ein kleines Verteilungsvolumen, eine niedrige Clearance und eine lange Halbwertszeit. Die lange Halbwertszeit resultiert aus der Bindung des Komplexes an HSA, welches laut der Fachinformation von CSL Behring "unter normalen Bedingungen eine durchschnittliche Halbwertszeit von 19 Tagen" aufweist. In der Literatur wird eine Halbwertszeit zwischen 17 und 27 Tagen beschrieben.

Das aufgetretene Doppel-Peak-Phänomen ab einer Konzentration von 400 mg FFC14A absolut kann nicht mit der langen Halbwertszeit von HSA oder noch nicht abgeschlossenen Verteilungsvorgängen erklärt werden. Höchstwahrscheinlich wurde dieses Phänomen durch die mehrfache Applikation der Infusionslösungen nacheinander hervorgerufen, da es unter einer absoluten Dosis von 400 mg nicht auftrat und eine Mehrfachapplikation erst ab 400 mg stattgefunden hatte.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnte die maximale tolerierbare Dosis (MTD) nicht ermittelt werden, da eine weitere Dosissteigerung aufgrund des dafür notwendigen hohen Infusionsvolumens für die Patienten nicht zumutbar war. Bei keinem der in die Studie eingeschlossenen Patienten wurden bis zu einer Dosis von 600 mg toxische Nebenwirkungen festgestellt. Ursachen hierfür kann die hohe Bindung von FFC14A an Serumproteine sein, denn es kann davon ausgegangen werden, dass nur der freie Anteil von FFC14A zu toxischen Effekten führt. Um das Verhalten von FFC14A im Organismus besser analysieren zu können, hätten die Proben nach jeder Infusion engmaschiger entnommen werden müssen, um ein noch deutlicheres und aussagekräftigeres Profil erstellen zu können.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Ermittlung der Pharmakokinetik von *trans*-Natrium-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat (III) Komplexes (FFC14A) im Rahmen einer klinischen Phase I-Studie mit Dosisescalation bis zur maximale tolerierbaren Dosis (MTD), um daraus Rückschlüsse auf seinen Wirkungsmechanismus zu gewinnen. Hierzu wurde eine "inductively coupled plasma mass spectrometry" (ICP-MS) Analytik entwickelt und validiert, mit der die Ruthenium-Ionen-Konzentration im Plasma und Ultrafiltrat zuverlässig gemessen werden konnte. Die ermittelten Parameter lagen innerhalb der vorgeschriebenen Grenzen. Für die pharmakokinetische Auswertung wurden die Proben nach einem Studienprotokoll in einem Zeitraum von 10 Minuten vor bis zu 56 Stunden nach der Infusion gewonnen. Insgesamt wurden 8 Patienten aufgenommen, von denen zwei im Verlauf aus der Studie wegen Progredienz ihrer Erkrankung ausgeschlossen werden mussten. Alle Patienten erhielten in einem Zeitraum von 21 Tagen 6 Infusionen, deren Infusionsdauer pro Infusionsbeutel zwischen 6 Minuten und 50 Minuten lag.

Die wichtigsten Ergebnisse sind:

1. Die ICP-MS Analytik ist sehr selektiv und liefert schnell genaue Messergebnisse; alle geforderten Validierungskriterien der "standard operating procedure" SOP 12 (2003) konnten eingehalten werden.
2. Eine bestmögliche Konformität wurde in der Fittinganalyse mit einem Zwei-Kompartiment-Modell erreicht.
3. FFC14A hat eine niedrige Clearance, eine lange Halbwertszeit und ein kleines Verteilungsvolumen.
4. FFC14A hat eine Plasmaeiweißbindung von 99%. Im Ultrafiltrat konnten <1% freies FFC14A detektiert werden. Es bindet in geringen Mengen an DNA.
5. In der vorliegenden Studie zeigte FFC14A in den verabreichten Dosierungen keine toxischen Nebenwirkungen.
6. Eine Dosis von mehr als 600mg FFC14A konnte nicht verabreicht werden, weil das zu verabreichende Infusionsvolumen 2000 ml überschritten hätte.
7. Die MTD wurde deswegen nicht erreicht.

Ausblick: Eine Fortsetzung der Untersuchung von FFC14A kann nur mit anderen Verabreichungsformen wie liposomalen Formulierungen oder orale Verabreichung erfolgen, die eine weitere Dosissteigerung ermöglichen. Unabhängig davon erscheint wegen der hohen Bindung von FFC14A an Plasmaproteine die Synthese von Konjugaten von FFC14A und Humanserumalbumin (HSA) und deren präklinische und klinische Untersuchung erfolgversprechend.

6. Literaturverzeichnis

1. Albert, A. (1958): Chemical aspects of selective toxicity. Nature Publishing Group. 182(4633), 421-423
2. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1995): Molekularbiologie der Zelle. 3. Aufl., Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
3. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2011): Molekularbiologie der Zelle. 5. Aufl., Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
4. Bourier, G. (2009) 6. Auflage: Wahrscheinlichkeitsrechnung und schließende Statistik. 6. Aufl., Wiesbaden: Gabler Verlag/ GWV Fachverlage GmbH
5. Brockhaus Enzyklopädie (2006): Band 15 KIND-KRUS. Leipzig: F.A. Brockhaus GmbH
6. Brockhaus Enzyklopädie (2006): Band 23 RENT-SANTH. Leipzig: F.A. Brockhaus GmbH
7. Budzikiewicz, H., Schäfer, M. (2005): Massenspektrometrie – eine Einführung. 5. Aufl., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
8. Clarke, M. J. (1993): Ruthenium Complexes: Potential Roles in Anticancer Pharmaceuticals. In: Keppler, B. K. (ed.): Metal Complexes in Cancer Chemotherapy. S. 129-156. Weinheim, VCH Verlagsgesellschaft mbH
9. Depenbrock, H., Schmelcher, S., Peter, R., Keppler, B. K., Weirich, G., Block, T., Rastetter, J., Hanauske, A.-R. (1997): Preclinical activity of trans-indazolium[tetrachlorobisindazoleruthenate(III)] (NSC 666158; IndCR; KP1019) against tumour colony-forming units and haematopoietic progenitor cells. European Journal of Cancer, 33, No. 14, 2204-2410
10. Diehl, J., Arbinger, R. (2001): Einführung in die Inferenzstatistik. 3. Aufl., Eschborn: Verlag Dietmar Klotz GmbH
11. Dittrich, Ch. Prof. Dr. (2006): Signaltransduktion in der Onkologie. 1. Aufl., Bremen: UNI-MED Verlag AG
12. Doenecke, D., Koolman, J., Fuchs, G., Gerok, W. (2005): Karlsons Biochemie und Pathobiochemie. 15. Aufl., Stuttgart: Georg Thieme Verlag
13. Eckey, H.-F., Kosfeld, R., Türc, M. (2008): Deskriptive Statistik. 5. Aufl., Wiesbaden: Gabler Verlag/ GWV Fachverlage GmbH

14. Egger, A., Arion, V. B., Reisner, E., Cebrian-Losantos, B., Shova, S., Trettenhahn, G., Keppler, B. K. (2005): Reaktionen of Potent Antitumor Complex trans-[RuIIICl₄(indazole)₂]- with a DNA-Relevant Nucleobase and Thioethers: Insight into Biological Action. *Inorg. Chem.*, 44, 122-132
15. Faustus Forschungs Compagnie (2003): Investigators Brochure FFC14A
16. FEBS Federation of European Biochemical Societies. (1977): Albumin: Structure, Biosynthesis, Funktion. 11th Meeting Copenhagen, Vol. 50, Pergamon Press 1978
17. Fluorescence Detector, Operator`s Guide, Waters Corporation, USA
18. Food and drug administration. (2001): Guidance for industry: bioanalytical method validation
19. Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., (1998): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 7. Aufl., Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum Akademischer Verlag, 38-40
20. Galeano, A., Berger, M. R., Keppler, B. K. (1992): Antitumour activity of some ruthenium derivatives in human colon cancer cell lines *in vitro*. *Arzneimittel-Forschung/Drug Research*, 42, Nr. 6, 821-824
21. Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie (1938): Ruthenium, Systemnummer 63. 8. Aufl., Weinheim: Verlag Chemie GmbH
22. Gmelins Handbuch der Anorganischen Chemie (1938): Platin, Teil A, Systemnummer 68. 8. Aufl., Weinheim: Verlag Chemie GmbH,
23. Gugeler, N., Klotz, U. (2000): Einführung in die Pharmakokinetik. 2. Aufl., Eschborn: Govi-Verlag
24. Hartinger, Ch. G., Jakupec, M. A., Zorbas-Seifried, S., Groessl, M., Egger, A., Berger, W., Zorbas, H., Dyson, P. J., Keppler, B. K. (2008) : KP1019, A new redox-active anticancer agent – preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chemistry and Biodiversity*, Vol. 5, 2140-2155
25. Hartmann, M. (Diss.), (1995): Studien zur Metabolisierung und zum intrazellulären Wirkmechanismus tumoraffiner Ruthenium(III)komplexe : Methoden und Ansätze zur Weiterentwicklung tumorhemmender Rutheniumverbindungen, Mikrofiche-Ausgabe, Egelsbach, Frankfurt (Main): Hänsel-Hohenhausen, St. Peter Port
26. Helvi Hödrejäv (2004): „Gottfried Wilhelm Osann and ruthenium“ In: *Proc. Estonian Acad. Sci. Chem.*, 53, 3, 125-144
27. Hemester, M., Toms, A., Chemnitzer, R., Bruker Daltonics, Präsentation (2012): "High sensitivity ICP-MS: Overcome the problem of complex samples"

28. Holleman, A. F., Wiberg, N. (2007): Lehrbuch der Anorganischen Chemie. 102. Aufl., Walter de Gruyter
29. Houben-Wyel (1994): Methoden der organischen Chemie, Band E8b Heterene III/Teil 2. 4. Aufl., Stuttgart, Georg Thieme Verlag
30. <http://de.wikipedia.org/wiki/Informationskriterium>
31. http://de.wikipedia.org/wiki/Ruthenium#cite_note-9
32. Hunnius (1998): Pharmazeutisches Wörterbuch. 8. Aufl., Walter de Gruyter
33. Jaehde, U. (2010): Klinische Pharmakokinetik und Pharmakodynamik. In: Jaehde, U., Radziwill, R., Kloft, Ch.: Klinische Pharmazie Grundlagen und Anwendung 3. Aufl. , Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
34. Jarvis, K. E., Gray, A. L., Houk, R. S. (1992): Handbook of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, Blackie, USA, New York: Chapman and Hall
35. Keppler, B.K., Hartmann, M. (1994): New tumor-inhibiting metal complexes. Chemistry and antitumor properties. In: Metal-Based Drugs, Vol. 1, Nos. 2-3, 145-149
36. Keppler, B.K., Lipponer, K.-G., Stenzel, B., Kratz, F. (1993): New tumour-inhibiting ruthenium complexes. In: Keppler, B. K. (ed.): Metal Complexes in Cancer Chemotherapy. S. 189-220. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH
37. Kersten, L., Braunlich, H., Keppler, B. K., Gliesing, Ch., Wendelin, M., Westphal, J. (1998): Comparative nephrotoxicity of some antitumour-active Platinum and Ruthenium complexes in rats. Journal of applied Toxicology, 18, 93-101
38. Kinetica Version 4.2.0 User Manual (2003) Inna Phase Corporation
39. Krämer, I. (2003): Onkologische Pharmazie In: Jaehde, U., Radziwill, R., Mühlebach, A., Schunack, W. 2. Aufl.,: Lehrbuch der Klinischen Pharmazie, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
40. Kratz, F., Hartmann, M., Keppler, B., Messori, L. (1994): The Binding Properties of Two Antitumor Ruthenium(III) Complexes to Apotransferrin. JBC Vol. 269 (4), 2581-2588
41. Kratz, F., Keppler, B.K., Messori, L., Smith, C., Baker, E.N. (1994): Protein-binding properties of two antitumor Ru(III) complexes to human apotransferrin and apolactoferrin. In Metal-Based Drugs, Vol. 1, Nos. 2-3, 169-173
42. Kratz, F., Messori, L. (1993): Spectral characterization of Ruthenium(III) Transferrin. Journal of Inorganic Biochemistry, 49, 79-82

43. Kratz, F., Mullinacci, N., Messori, L., Bertini, I., Keppler, B.K. (1992): Kinetic, spectroscopic and LPLC studies of the interactions of antitumour Ruthenium (III) complexes with serum proteins In Anastassopoulou, J., Collery, Ph., Etienne, J.C., Theophanides, Th.: Metal Ions in Biology and Medicine, John Libby Eurotext, Paris: Vol. 2, S. 69-74
44. Langer, A., Borchert, H.-H., Mehnert, W. (2011): Biopharmazie Pharmakokinetik-Bioverfügbarkeit-Biotransformation 4. Aufl., Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
45. Langguth, P., Fricker, G., Wunderli-Allenspach, H. (2004): Biopharmazie. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
46. Less, W. R., Fleckenstein, M., Gottwald, W., Schröder, J. (2011): Lexikon Qualifizierung analytischer Daten. 1. Aufl. Würzburg: Vogel Buchverlag
47. Lexikon der Biochemie 1 (2004): München: Elsevier, Spektrum akademischer Verlag
48. Lexikon der Biochemie 2 (2004): München: Elsevier, Spektrum akademischer Verlag
49. Maeda, H., Wu, J., Sawa, T., Matsumura, Y., Hori, K. (2000): Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. Journal of Controlled Release, 65, p. 271-284
50. Manufacturing & Quality Audit Division, Centre for drug administration (2004): Guidance notes on analytical method validation: methodology
51. Matsumura, Y., Maeda, H. (1986): A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumor tropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res., 46, 6387-92
52. Meyer, V. R. (2004): Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie. 9 Aufl. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA
53. Millenium Software 4.0 Chromatographiemanager von Waters GmbH, Eschborn
54. Montaser, A. (1998): Inductively coupled plasma mass spectrometry. Wiley-VCH
55. Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H., Ruth, P., Schäfer-Korting, M. (2008): Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 9. Aufl., Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
56. Nachtigall, Ch., Wirtz, M. (2009) 5. Auflage : Wahrscheinlichkeitsrechnung und Inferenzstatistik, Juventa Verlag Weinheim und München
57. Oberdisse, E., Hescheler, J. (2002): Pharmakologie und Toxikologie. 3. Aufl., Berlin: Springer Verlag
58. PDA-Detektor, Bedienungsanleitung, Waters Corporation, USA

59. Pfeifer, S., Pfliegel, P., Borchert, H. (1995): Biopharmazie Pharmakokinetik-Bioverfügbarkeit-Biotransformation. Ullstein Mosby GmbH & Co.KG
60. Pieper, T., Keppler, B.K. (1998): Tumor-inhibiting Ruthenium complexes – formulation and analytical characterization. *Analysis Magazine* 26(6), 84-87
61. Pitchkov, V. N. (1996): The Discovery of Ruthenium. *Platinum Metals Rev.* 40, (4), 181-188
62. Pongratz, M., Schluga, P., Jakupec, M.A., Arion, V.B., Hartinger, Ch.G., Allmaier, G., Keppler, B.K. (2004): Transferrin binding and transferring-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP 1019, studied by means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. *JAAS* 19, 46-51
63. Quinlan, G., Martin, G., Evans T. (2005): Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*,. 41(6), 1211-1219
64. Riedel, E., Janiak, Ch. (2007): Anorganische Chemie. 7. Aufl., Berlin: Walter de Gruyter
65. Rücker, G., Neugebauer, M., Willems, G.G. (2008): Instrumentelle pharmazeutische Analytik. 4. Aufl., Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
66. Satter, H. (1962): Paul Ehrlich, Begründer der Chemotherapie; Leben, Werk, Vermächtnis. München: Verlag Oldenbourg
67. Scheulen, M. E. (2012): Frühe klinische Medikamentenentwicklung in der Onkologie. *WTZ-Journal* 4 (2) 4-9
68. Seddon, K. R. (1996) : Ruthenium: „A Dance to the Music of Time”. *Platinum Metals Rev.* 40 (3), 128-134
69. Seddon, E.A. and Seddon, K.R. (1984): „The chemistry of Ruthenium“, Amsterdam: Elsevier
70. Smith. C.A., Sutherland-Smith, A.J., Keppler, B.K., Kratz, F., Baker, E.N. (1996): Binding of Ruthenium(III) anti-tumor drugs to human lactoferrin probed by high resolution X-ray crystallographic structure analyses. *JBIC*, 1, 424-431
71. SOP 12: Validation of bioanalytical methods(2003). *Onkologie Suppl.*, 6, 52-55
72. Stehle, G., Sinn, H., Wunder, A., Schrenk, H.H., Schütt, S., Maier-Borst, W., Heene, D.L. (1997): The loading rate determines tumor targeting properties of methotrexate-albumin conjugates in rats. *Anticancer Drugs*. 8(7), 677-685
73. Stehle, G., Sinn, H., Wunder, A., Schrenk, H.H., Stewart, J.Ch., Hartung, G., Maier-Borst, W., Heene, D.L. (1997): Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself-implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 26(2), 77-100

74. Therasse, P., Arbuck, S.G., Eisenhauer, E.A., Wanders, J., Kaplan, R.S., Rubinstein, L., Verweij, J., van Glabbeke, M., van Oosterom, A.T., Christian, M.C., Gwyther, S.G. (2000): New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. *JNCI*. 92 (3), 205-216
75. Thomas, R. (2001): A Beginner`s Guide to ICP-MS, Part I, Tutorial. *Spectroscopy* 16, (4), 38-42
76. Thomas, R. (2001): A Beginner`s Guide to ICP-MS, Part II, Tutorial. *Spectroscopy* 16, (5), 56-60
77. Thomas, R. (2001): A Beginner`s Guide to ICP-MS, Part III, Tutorial. *Spectroscopy* 16, (6), 26-30
78. Thomas, R. (2001): A Beginner`s Guide to ICP-MS, Part IV, Tutorial. *Spectroscopy* 16, (7), 26-28
79. Thomas, R. (2001): A Beginner`s Guide to ICP-MS, Part V, Tutorial. *Spectroscopy* 16, (9), 38-44
80. Thomas, R. (2001): Beginner`s Guide to ICP-MS, Part VI, Tutorial. *Spectroscopy* 16, (10), 44-48
81. Thomas, R. (2001): A Beginner`s Guide to ICP-MS, Part X, Tutorial. *Spectroscopy* 17, (4), 34-39
82. Voß, W. (2000): Taschenbuch der Statistik. 1. Aufl. Leipzig: Fachbuchverlag
83. Wagner, G. (1970): Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie. 2. Aufl. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit
84. Weitschies, W., Bernsdorf, A., Giessmann, T., Zschiesche, M., Modess, C., Hartmann, V., Mrazek, C., Wegner, D., Nagel, S., Siegmund, W. (2005): The talinolol double-peak phenomenon is likely caused by presystemic processing after uptake from gut lumen. *Pharmaceutical Research*. 22(5), 728-35
85. Wirtz, M., Nachtigall, Ch. (2008): Deskriptive Statistik. 5. Aufl. Weinheim und München: Juventa Verlag
86. www.abraxane.com/downloads/Abraxane_PrescribingInformation.pdf
87. Zenz, M., Strumpf, M., Willweber-Strumpf, A. (2004): Taschenbuch der Schmerztherapie. 2. Aufl. Stuttgart: Wissenschaftliche Verl.-Ges.

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

ADEM	Absorption, Distribution, Metabolismus, Exkretion
ALAT (GPT)	Alaninaminotransferase (Glutamat-Pyruvat-Transaminase)
ASAT (GOT)	Aspartataminotransferase (Glutamat-Oxalacetat-Transaminase)
AUC	Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (area under the curve)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 (Protein)
c _{max}	maximale Konzentration
CT	Computerised tomography
dbi	directly before infusion
DLT	dose limiting toxicity
DDEM	discrete dynode electron multiplier
EPR	Enhanced Permeability and Retention
5-FU	5-Fluorouracil
Hb	Hämoglobin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Hochleistungs- Flüssigchromatographie)
HSA	Humanserumalbumin
ICP-MS	inductively coupled plasma mass spectrometry
KG	Körpergewicht
LD ₅₀	mittlere letale Dosis
Leuko	Leukozyten
LPLC	Low Pressure Liquid Chromatography (Niederdruckchromatographie)
MRI	magnetic resonance imaging
MTD	maximal tolerable dose
MW	molecular weight
NCI-CTC	National Cancer Institute Common Toxicity Criteria
NMRI	Naval medical research institute
NSCLC	Non small cell lung cancer
Psi	pound per square inch
QCS	Quality control sample
t _{1/2}	Halbwertszeit
TDL	toxic dose level

Anhang

RD	recommended dose
RECIST	Response Evaluation Criteria in Solid Tumours
ULN	upper limit of normal

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	<i>trans</i> -Natrium-tetrachlorobis(1H-indazol)ruthenat (III)/Indazolhydrochlorid...10
Abbildung 2	1,2-Benzopyrazol12
Abbildung 3	Musteraufbau einer HPLC-Anlage28
Abbildung 4	Chromatogramm von Indazol mit Gradientenverlauf31
Abbildung 5	Kalibriergrade im Ultrafiltrat59
Abbildung 6	Kalibriergrade im Plasma.....53
Abbildung 7	Kalibriergrade im Urin65
Abbildung 8	Darstellung der Selektivität (Linie: schwarz 50 ng/ml, rot 5 ng/ml, blau 1 ng/ml, grün NaCl)68
Abbildung 9	Kalibriergrade in NaCl 0,9%69
Abbildung 10.	Proteinfractionierung und anschließende Rutheniumbestimmung.....66
Abbildung 11	Patient 1, Ein-Kompartiment-Modell, 5.Gabe74
Abbildung 12	Patient 1,Zwei-Kompartiment-Modell, 5.Gabe75
Abbildung 13	Patient 8 (600 mg): Spaghetti Plot, 1. und 5. Gabe.....69
Abbildung 14	Patient 1 (25 mg): Spaghetti Plot, 1. und 5. Gabe.....76
Abbildung 15	Doppelpeak Vergleich P01 bis P0877
Abbildung 16	Bindungsreaktion und Stabilität von FFC14A mit Albumin, halblogarithmische Darstellung80
Abbildung 17	Graphische Darstellung der Urinkinetik nach 1. Gabe81
Abbildung 18	Box-Whisker-Plots, in einer 5/95% Perzentilldarstellung mit Median (durchgezogene Linie), Mittelwert (rote gestrichelte Linie) und Ausreißern (schwarze Punkte).....76/84
Abbildung 19	Zusammenhang zwischen applizierter und gemessener Dosis im Plasma88
Abbildung 20	Zusammenhang zwischen applizierter und gemessener Dosis im Ultrafiltrat....89

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Zeitlicher Verlauf und Zusammensetzung des Fließmittels.....	24
Tabelle 2	Patientenaufnahme nach beschleunigtem Dosisescalations-Protokoll.....	43
Tabelle 3	Patientenaufnahme nach modifiziertem Fibonacci-Protokoll.....	43
Tabelle 4	Diagramm des Probenentnahme-Protokolls Tage 1 bis 8.....	44
Tabelle 5	Diagramm des Probenentnahme-Protokolls Tage 11 bis 28.....	44
Tabelle 6	Patientenübersicht	45
Tabelle 7	Untersuchung der Selektivität im Ultrafiltrat.....	51
Tabelle 8	Linearitätsmessungen im Ultrafiltrat	52
Tabelle 9	Linearitätsmessungen im Plasma.....	53
Tabelle 10	Wiederfindungsrate (WFR) im Ultrafiltrat.....	54
Tabelle 11	Wiederfindung (WFR) in Plasma	54
Tabelle 12	Richtigkeit im Plasma.....	62
Tabelle 13	Richtigkeit im Ultrafiltrat	56
Tabelle 14	Präzision im Plasma.....	56
Tabelle 15	Präzision im Ultrafiltrat	57
Tabelle 16	Selektivität im Urin	57
Tabelle 17	Linearitätsmessung im Urin.....	65
Tabelle 18	Wiederfindung (WFR) im Urin	66
Tabelle 19	Richtigkeit im Urin.....	60
Tabelle 20	Präzision im Urin.....	67
Tabelle 21	Linearität Indazol in NaCl 0,9%	69
Tabelle 22	Wiederfindungsbestimmung von Indazol.....	70
Tabelle 23	Präzision von Indazol in NaCl.....	70
Tabelle 24	Richtigkeit von Indazol in NaCl.....	71
Tabelle 25	Kriterien des Modellfittings.....	74
Tabelle 26	Pharmakokinetische Parameter in Plasma berechnet mit Kinetica 4.2, Zwei-Kompartiment-Modell	78

Tabelle 27	Pharmakokinetische Parameter in Plasma berechnet mit Kinetica 4.2, Zwei-Kompartiment-Modell, 1. bis 6. Infusion kumulativ dargestellt.....	72
Tabelle 28	Kriterien des Modellfittings beispielhaft für Patient P08	82
Tabelle 29	Pharmakokinetische Parameter im Ultrafiltrat berechnet mit Kinetica 4.2, Zwei-Kompartiment-Modell, 1. bis 6. Infusion kumulativ dargestellt.....	82
Tabelle 30	Gepaarte Gruppenanalyse	84
Tabelle 31	Gegenüberstellung der gemessenen Rutheniumkonzentrationen im Plasma.....	87
Tabelle 32	Gegenüberstellung der gemessenen Rutheniumkonzentrationen im Ultrafiltrat	80

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. M.E. Scheulen danke ich für das sehr interessante Thema und die Revision dieser Arbeit.

Herrn Dr. Ralf Axel Hilger danke ich für die sehr gute Betreuung, Unterstützung, die zahlreichen Ratschläge, die Korrektur dieser Arbeit und immer eine Gesprächsbereitschaft für Fragen aller Art.

Ich danke besonders Frau Dagmar Thyssen und Herrn Matthias Grubert, die durch Ihre große Erfahrung auf dem Gebiet der klinisch-pharmakologischen Analytik mich jederzeit sowohl mit sehr wichtigen und bedeutenden Aussagen unterstützt haben als auch mir bei der Durchführung meiner Untersuchungen geholfen haben.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Westdeutschen Tumorzentrums für Ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität.

Ich Danke Herren Dr. Sellinghoff für die Korrektur dieser Arbeit.

Ich Danke meiner Familie für die Unterstützung während meiner gesamten Arbeit. Mit ihrer Hilfe konnte ich diese Arbeit erstellen.

9. Curriculum Vitae

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.